

INTERZELLULÄRE KOMMUNIKATION DURCH ENDOTHELIALE MIKROVESIKEL MICRORNAS *IN VITRO UND IN VIVO*

ANNE CHRISTINE MARON

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie,
Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

und dem

Institut für Kardiovaskuläre Regeneration,
Zentrum für Molekulare Medizin, Goethe-Universität Frankfurt
Betreuerin: Prof. Dr. Stefanie Dimmeler

**INTERZELLULÄRE KOMMUNIKATION DURCH
ENDOTHELIALE MIKROVESIKEL-MICRORNAS
*IN VITRO UND IN VIVO***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Anne Christine Maron

Tierärztin aus Frankfurt a.M.

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Martin Diener

Prof. Dr. Stefanie Dimmeler

Tag der Disputation: 01.10.2015

Meinen Eltern.

In Liebe und Dankbarkeit.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACE	<i>Angiotensin-converting-enzyme</i> , Angiotensin-konvertierendes Enzym
Ago	Argonautenprotein
AMI	<i>Acute myocardial infarction</i> , akuter Myokardinfarkt
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , einfaktorielle Varianzanalyse
AoSMC	<i>Aortic smooth muscle cells</i> , Primäre glatte Muskelzellen aus der Aorta
AP-1	Aktivator Protein-1
ApoE	Apolipoprotein E
ARF	<i>ADP-ribosylation factor</i>
Arg1	Arginase 1
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
C. elegans, cel	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , komplementäre DNA
c-kit	Tyrosinkinase KIT
CO ₂	Kohlendioxid
C _T	<i>Threshold cycle</i>
ctrl	Kontrolle
CX ₃ CL1	CX ₃ C-Motiv-Chemokin-Ligand 1

CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin-Ligand 12
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EC	<i>Endothelial cells</i> , Endothelzelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGM	<i>Endothelial Cell Growth Medium</i>
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPC	<i>Endothelial progenitor cell</i> , Endotheliale Progenitorzelle
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
EtOH	Ethanol
EV	Extrazelluläre Vesikel
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
Fizz1	<i>Found in inflammatory zone 1</i>
g	Gravitationskonstante
G	Guanin
GA	Gentamycin/Amphotericin-B
GM-CSF	Granulozyten-/Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HCM	<i>Human cardiomyocytes</i> , humane Kardiomyozyten
HDL	<i>High density lipoprotein</i> , Lipoprotein hoher Dichte

hEGF	<i>Human Epidermal Growth Factor</i> , humaner epidermaler Wachstumsfaktor
HEK293T	<i>Human Embryonic Kidney Cells</i> , humane embryonale Nierenzellen
HFD	<i>High fat diet</i> , stark fetthaltige Diät
hFGF	<i>Human Fibroblast Growth Factor</i>
Hsa	<i>Homo sapiens</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i> , hämatopoetische Stammzelle
HSPC	<i>Hematopoietic stem and progenitor cell</i> , hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> , Primäre Endothelzellen der Nabelschnurvene
i.p.	<i>Intraperitoneal</i>
i.v.	<i>Intravenös</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KLF	<i>Krüppel-like factor</i>
LCA	<i>Left coronary artery</i> , linke Koronararterie
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> , Lipoprotein geringer Dichte
lncRNA	<i>Long noncoding RNA</i> , lange nichtkodierende RNA
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i> , magnetische Zellseparation

MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i> , Monozyten-Chemoattraktor-protein-1
M-CSF	Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor
mECH5V	<i>Mouse endothelial cells H5V</i> , murine Endothelzellen H5V
MGM	<i>Myocyte growth medium</i> , Myozyten-Wachstumsmedium
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MI	<i>Myocardial infarction</i> , Myokardinfarkt
min	Minuten
miRNA, miR	MicroRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	<i>Messenger RNA</i> , Boten-RNA
MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i> , mesenchymale Stammzelle
MuLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
MV	Mikrovesikel
MVB	<i>Multivesicular bodies</i> , multivesikuläre Körperchen
ncRNA	<i>Noncoding RNA</i> , nichtkodierende RNA
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nt	Nukleotid(e)
O ₂	Sauerstoff
ORF	<i>Open reading frame</i> , offenes Leseraster
Ox-LDL	Oxidiertes Lipoprotein geringer Dichte
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDCD6IP	<i>Programmed cell death 6 interacting protein</i>
piRNA	<i>Piwi-interacting RNA</i> , piwiinteragierende RNA
Pre-miR	<i>Precursor microRNA</i> , Vorläufer microRNA
Pri-miR	<i>Primary transcript of microRNA</i> , primäres microRNA-Transkript
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
Re	Reynolds-Zahl
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPLP0	<i>Ribosomal protein, large, P0</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
s.c.	<i>Subcutan</i>
sca-1	Stammzellantigen-1
SCF	<i>Stem cell factor</i> , Stammzellfaktor
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Mittelwert \pm Standardfehler
siRNA	<i>Small interfering RNA</i> , kleine interferierende RNA
SMC	<i>Smooth muscle cell</i> , glatte Muskelzelle

SNARE	<i>Soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptor</i>
sncRNA	<i>Small noncoding RNA</i> , kleine nichtkodierende RNA
snoRNA	<i>Small nucleolar RNA</i> , kleine nukleoläre RNA
snRNA	<i>Small nuclear RNA</i> , kleine nukleäre RNA
SR	Scavenger Rezeptor
T	Thymin
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TierSchG	Tierschutzgesetz
T-Lymphozyt	Thymus-Lymphozyt
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRBP	<i>Trans-activation response RNA-binding protein</i>
tRNA	Transfer RNA
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101 protein</i>
U	Uracil
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , Endothelwachstumsfaktor
vs	<i>Versus</i>
WHO	<i>World health organization</i>
WT	Wildtyp
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Inhaltsverzeichnis	11
1 Einleitung	18
1.1 Das kardiovaskuläre System	18
1.1.1 Funktionen	18
1.1.2 Aufbau des Blutkreislaufs und des Herzens	18
1.1.3 Aufbau der Blutgefäße.....	20
1.1.4 Strömungsverhältnisse und Schubspannung	22
1.2 Erkrankungen des kardiovaskulären Systems.....	24
1.2.1 Atherosklerose	25
1.2.1.1 Ätiologie der Atherosklerose	25
1.2.1.2 Pathogenese der Atherosklerose	25
1.2.1.3 Rolle der Immunzellen und der Milz in der Atherogenese	29
1.2.1.4 Folgen der Atherosklerose.....	30
1.2.2 Akuter Myokardinfarkt.....	31
1.3 Nicht-kodierende RNAs.....	32
1.4 MicroRNAs	34
1.4.1 Funktionen von miRNAs.....	35
1.4.2 MicroRNAs im kardiovaskulären Bereich	37
1.5 Interzelluläre Kommunikation	40
1.5.1 Extrazelluläre microRNAs in interzellulärer Kommunikation	40
1.5.2 Extrazelluläre Vesikel.....	43
1.5.2.1 Apoptotische Körperchen	43

1.5.2.2	Mikrovesikel	44
1.5.2.3	Exosomen	44
1.5.2.4	Aufnahme und Interaktion der extrazellulären Vesikel mit Empfängerzellen	45
1.6	Ziel der Arbeit	47
2	Material und Methoden	49
2.1	Material	49
2.1.1	Verbrauchsmaterial	49
2.1.2	Technische Geräte	50
2.1.3	Kits	51
2.1.4	Reagenzien und Chemikalien	52
2.1.5	Zytokine	53
2.1.6	Primer	54
2.1.6.1	Primer für SYBR green qRT-PCR	54
2.1.6.2	Taqman assays	54
2.1.7	Antikörper FACS	55
2.1.8	Zellkultur – primäre Zellen, Zelllinien	57
2.1.9	Zellkultur–Medien	57
2.1.10	Tiere	58
2.1.10.1	Futter	58
2.1.10.2	Verwendete Mäuse (<i>Mus musculus</i>)	58
2.1.10.3	Medikamente	59
2.1.11	Software	60
2.2	Methoden	61
2.2.1	Zellkultur	61

2.2.1.1	Isolation von CD14+ Monozyten aus menschlichem peripheren Blut	61
2.2.1.2	Differenzierung von CD14+ Monozyten zu Makrophagen	61
2.2.1.3	Kultivierung der Zellen	62
2.2.1.4	Passage und Ausbringung der Zellen	63
2.2.1.5	Transduktion der Zellen (HUVEC, mECH5V)	64
2.2.1.6	Transfektion der Zellen (HUVEC, mECH5V) mit rekombinanter cel-miR-39 bzw. pre-miR-92a	64
2.2.2	Extrazelluläre Vesikel.....	66
2.2.2.1	Generierung von extrazellulären Vesikeln (EV) durch HUVECs und mECH5Vs	66
2.2.2.2	Isolation von Mikrovesikeln aus Überständen von HUVECs und mECH5Vs.....	66
2.2.2.3	Transfer von Mikrovesikeln zu Empfängerzellen	67
2.2.2.4	Aufarbeitung der isolierten Mikrovesikel für die Injektion in die Maus	67
2.2.2.5	Aufarbeitung der isolierten Mikrovesikel für RNA-Analyse.....	67
2.2.3	Durchflusszytometrie der Zellen	67
2.2.4	Molekulare Biologie	70
2.2.4.1	RNA-Isolation mit QIAzol® und miRNeasy Mini Kit	70
2.2.4.2	RNA-Isolation mit QIAzol®, miRNeasy Mini Kit und dem QIAcube.....	70
2.2.4.3	RNA-Konzentrationsbestimmung	70
2.2.4.4	Reverse Transkription von mRNA	71
2.2.4.5	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) von mRNA	71
2.2.4.6	Reverse Transkription von miRNA.....	73

2.2.4.7	qRT-PCR von miRNAs	74
2.2.5	Tierversuche	75
2.2.5.1	Haltebedingungen der Tiere	75
2.2.5.2	Intravenöse Injektion der Mikrovesikel in die Schwanzvene (<i>Vena caudalis</i>).....	76
2.2.5.3	Modell des akuten Myokardinfarkts.....	76
2.2.5.4	Atherosklerose-Modell in ApoE ^{-/-} Mäusen	78
2.2.5.5	Organentnahme und Aufarbeitung für RNA-Isolation.....	78
2.2.5.6	Gewinnung von mononukleären Zellen aus der Milz über Dichtegradienten.....	79
2.2.5.7	Gewinnung von Makrophagen aus der Bauchhöhle.....	79
2.2.5.8	Aktivierung der Differenzierung von Peritoneal-Makrophagen zu M1- oder M2-Makrophagen	80
2.2.6	Histologie.....	81
2.2.6.1	Paraffineinbettung und Gewebeschnitte.....	81
2.2.6.2	Kollagenfärbung mit Pikro-Siriusrot.....	81
2.2.6.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	82
2.2.7	Statistik	82
3	Ergebnisse	83
3.1	Charakterisierung und Quantifizierung des Transfers von mit microRNAs beladenen Mikrovesikeln in unterschiedliche Empfängerzellen	83
3.1.1	Mikrovesikel von mock/KLF2-transduzierten HUVECs transferieren cel-miR-39 <i>in vitro</i> in unterschiedlichem Maße zu Empfängerzellen des kardiovaskulären Systems.....	83

3.1.2	Mikrovesikel von mock/KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen transferieren die exogene microRNA cel-miR-39 <i>in vitro</i> in mononukleäre Zellen der Milz von C57BL/6J Mäusen	91
3.2	Transfer der mit cel-miR-39 beladenen Mikrovesikel von murinen Endothelzellen in unterschiedliche Gewebe von Kontrollmäusen	92
3.2.1	Mikrovesikel von KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen sind nach intravenöser Injektion <i>in vivo</i> nicht in der Lage, cel-miR-39 in nicht aktiviertes Gewebe zu transferieren	94
3.2.2	Die Milz von gesunden C57BL/6J Mäusen zeigt nach intravenöser Injektion der Mikrovesikel von murinen Endothelzellen lediglich einen minimalen Anstieg an cel-miR-39	97
3.3	Transfer von cel-miR-39-beladenen, endothelialen Mikrovesikeln in zwei unterschiedlichen Krankheitsmodellen	99
3.3.1	Transfer im murinen Myokardinfarkt-Modell	99
3.3.1.1	Mikrovesikel von KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen transferieren cel-miR-39 <i>in vivo</i> nur geringfügig in durch akuten Myokardinfarkt aktiviertes Gewebe	100
3.3.1.2	Mikrovesikel von KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen sind <i>in vivo</i> nicht in der Lage, die endogene miR-92a in durch akuten Myokardinfarkt aktiviertes Gewebe von miR-92a ^{-/-} Mäusen zu transferieren	103
3.3.2	Transfer im murinen Atherosklerose-Modell	105
3.3.2.1	Mikrovesikel von murinen Endothelzellen transportieren die exogene cel-miR-39 <i>in vivo</i> in die durch Atherosklerose aktivierte Milz	105
3.3.3	Biologische Funktion der Mikrovesikel im murinen Atherosklerose-Modell	109

3.3.3.1	Mikrovesikel von KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen reduzieren tendenziell <i>in vivo</i> den Anteil an M1-Makrophagen in der Milz von ApoE ^{-/-} Mäusen.....	109
3.4	Inkubation von Makrophagen mit Mikrovesikeln von mock/KLF2-transduzierten Endothelzellen führt <i>in vitro</i> zu einer Erhöhung der M1-Marker und der Zellzahl.....	118
4	Diskussion	125
4.1	Mikrovesikel von transduzierten & transfizierten Endothelzellen transportieren miR in Zellen des kardiovaskulären Systems.....	125
4.2	Mikrovesikel von transduzierten & transfizierten Endothelzellen transferieren miR in Splenozyten.....	130
4.3	Mikrovesikel von transduzierten & transfizierten Endothelzellen transferieren miR <i>in vivo</i> lediglich in die Leber	130
4.4	Transfer von endothelialen Mikrovesikeln im akuten Myokardinfarkt-Modell	132
4.4.1	Geringer Transport von miR aus transduzierten & transfizierten Endothelzellen in Zielgewebe trotz Aktivierung durch Myokardinfarkt.....	132
4.5	Transfer von endothelialen Mikrovesikeln im Atherosklerose-Modell.....	135
4.5.1	Mikrovesikel von transduzierten & transfizierten Endothelzellen transportieren miR <i>in vivo</i> in die durch Atherosklerose aktivierte Milz.....	135
4.5.2	Mikrovesikel von KLF2-transduzierten Endothelzellen reduzieren <i>in vivo</i> den Anteil an M1-Makrophagen in der Milz leicht.....	137
4.6	Inkubation von Makrophagen mit Mikrovesikeln von transduzierten Endothelzellen führt <i>in vitro</i> zu einer Erhöhung der M1-Marker und der Zellzahl.....	139
4.7	Fazit und Ausblick	141
5	Zusammenfassung.....	145

6	Summary	147
	Referenzen	149
	Eidesstattliche Erklärung	157
	Danksagung	158

1 Einleitung

1.1 Das kardiovaskuläre System

1.1.1 Funktionen

Das aus dem Herzen, den Blutgefäßen und dem darin zirkulierenden Blut bestehende kardiovaskuläre System stellt einen Blutkreislauf dar, der in der Lage ist den gesamten Körper adäquat mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Gleichzeitig werden Metaboliten aufgenommen und zum Ort der Ausscheidung transportiert. Außerdem dient der Blutkreislauf der Verteilung und dem Transport von Hormonen, Immunglobulinen, Gerinnungsfaktoren und anderen Botenstoffen innerhalb des Körpers. Der Kreislauf spielt eine Rolle bei Abwehrvorgängen und Immunantworten, da er Zellen des Immunsystems beherbergt und diese zu ihrem Wirkort befördert. Er ist maßgeblich verantwortlich für die Thermoregulation, die Aufrechterhaltung des hydrostatischen Drucks in den Kapillaren und der Homöostase in der Interstitialflüssigkeit, sowie für die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts.

1.1.2 Aufbau des Blutkreislaufs und des Herzens

Beim Menschen besteht der Kreislauf aus zwei hintereinander geschalteten Kreisläufen, dem Körperkreislauf (großer Kreislauf) zwischen linker Herzkammer und rechtem Herzvorhof und dem Lungenkreislauf (kleiner Kreislauf) zwischen rechter Herzkammer und linkem Herzvorhof. Diese Zweiteilung des Kreislaufs beinhaltet ebenfalls eine anatomische und funktionelle Teilung des Herzens in einen arteriellen (links) und einen venösen Anteil (rechts) (Abb.1). Beide Herzhälften bestehen aus dem Herzvorhof (lat. *Atrium cordis*) und der Herzkammer (lat. *Ventriculus cordis*), wobei das Blut durch die linke Herzkammer in die Aorta gepumpt wird und von dort aus über Arterien und Arteriolen schließlich in die Kapillaren gelangt, die durch ihren großen Gesamtquerschnitt und der damit einhergehenden niedrigen Flussgeschwindigkeit den Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe ermöglichen¹. Nach dem Kapillarbett fließt das Blut durch Venolen und Venen in die Hohlvene (lat. *Vena cava*) und damit zurück

zum Herzen. Die *Vena cava* mündet dabei in den rechten Vorhof, von wo aus das Blut in die rechte Kammer gelangt, die das sauerstoffarme Blut über die Arterien (lat. *Arteriae pulmonales*) des kleinen Kreislaufs (Lungenkreislauf) in die Lungenkapillaren pumpt, wo der Gasaustausch stattfindet. Abschließend gelangt das sauerstoffreiche Blut über die Pulmonalvenen (lat. *Venae pulmonales*) wieder zum linken Herzen.

Die Binnenräume des Herzens sind mit einem einschichtigen Endothel, dem Endokard (lat. *Endocardium*) ausgekleidet, es folgt das Myokard (lat. *Myocardium*), das hauptsächlich aus Kardiomyozyten besteht. Die Kammeroberfläche wird als Epikard (lat. *Epicardium*) bezeichnet und der gesamte Herzmuskel ist von einem bindegewebigen Beutel, dem Perikard (lat. *Pericardium*), umgeben. Um eine optimale Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zu gewährleisten, pumpt das Herz ca. 10% der in der Systole geförderten Blutmenge in die zwei herzeigenen, aus der Aortenwurzel entspringenden Gefäße, die Koronararterien (lat. *Aa. coronariae*). Während die rechte Koronararterie den rechten Ventrikel und einen kleinen Hinterwandanteil des linken Ventrikels versorgt, liefert die linke Koronararterie das Blut zum linken Ventrikel, großen Teilen des Septums und einem kleinen Vorderwandanteil des rechten Ventrikels.

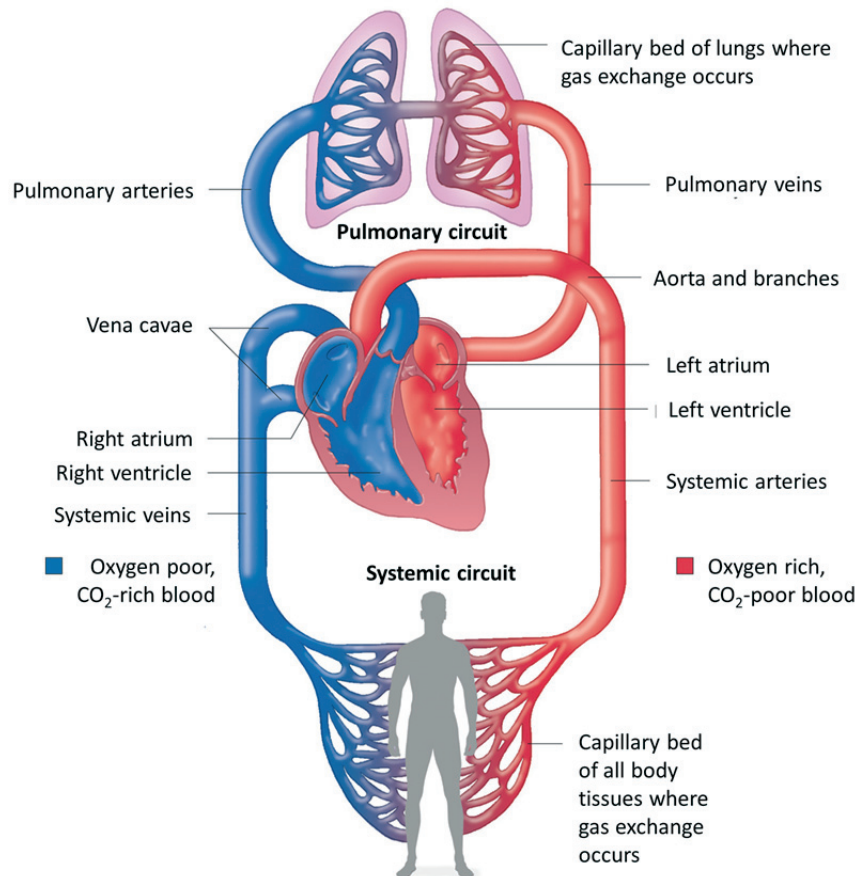


Abb. 1: Der Blutkreislauf bestehend aus Körper- und Lungenkreislauf. (modifiziert nach²)

In der Lunge wird das Blut mit Sauerstoff versorgt, gelangt anschließend über die linke Herzhälfte und die Aorta in den gesamten Körper und nach mehrfacher Verzweigung der Arterien zu Arteriolen schließlich in die Kapillaren. Dort findet der Stoffaustausch mit dem Gewebe statt. Anschließend wird das sauerstoffarme Blut über die Venolen und Venen dem rechten Herzen zugeführt, von wo es über die Pulmonalarterien erneut zur Lunge gelangt.

1.1.3 Aufbau der Blutgefäße

Die Blutgefäße des gesamten Körpers lassen sich in Arterien, Venen und Kapillaren unterteilen. Die meisten Blutgefäße bestehen aus einer dreischichtigen Wand, die aus *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica externa* (= *Tunica adventitia*) zusammengesetzt ist.

Die innerste Schicht, *Tunica intima*, ist zum Lumen hin mit einer einschichtigen Endothelzellschicht (*Lamina endothelialis*) ausgekleidet, an die sich nach außen hin das kollagenhaltige *Stratum subendotheliale* und die *Membrana elastica interna* anschließen. Die *Tunica media* setzt sich zum größten Teil aus glatten Muskelzellen

(engl. *smooth muscle cells*, SMCs) und elastischen Fasern zusammen, wohingegen die *Tunica externa*, die äußerste Schicht, vor allem aus elastischen Fasern und Kollagen besteht, aber auch Nervenendigungen und kleine Gefäße (*Vasa vasorum*) enthalten kann³(Abb.2). Die Versorgung der Gefäßwände selbst erfolgt zum einen transintimal (über v.a. sehr kleine Gefäße) und zum anderen durch die Gefäße der Gefäße, die *Vasa vasorum*.

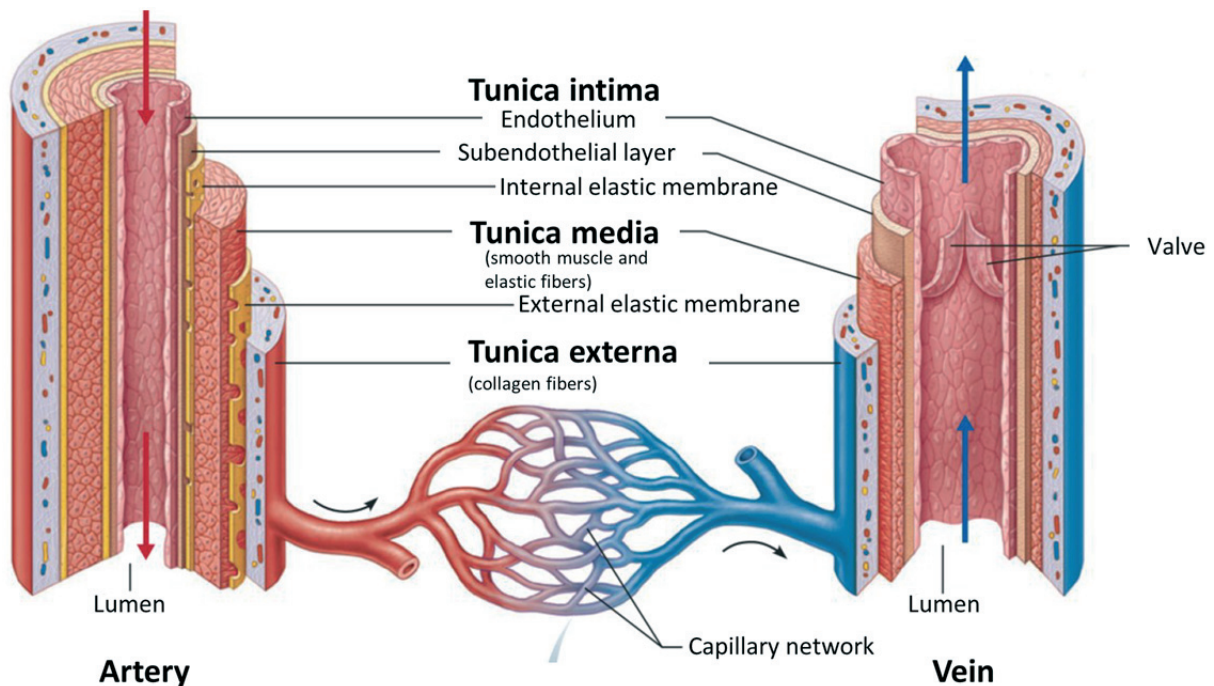


Abb. 2: Aufbau von Arterien, Venen und Kapillaren. (modifiziert nach⁴)

Wände der Arterien und Venen sind von der *Tunica intima* mit einschichtigem Endothel und kollagenhaltigem *Stratum subendotheliale* ausgekleidet, woran sich nach außen hin die aus glatten Muskelzellen und elastischen Fasern bestehende *Tunica media* anschließt, die schließlich von der äußersten Schicht, der kollagenreichen *Tunica externa*, umgeben wird. Ausschließlich die Arterien können zur Erhöhung ihrer Elastizität zusätzlich zwei elastische Membranen, die *Membrana elastica interna* zwischen *Tunica intima* und *Tunica media* und die *Membrana elastica externa* zwischen *Tunica media* und *Tunica externa* besitzen.

1.1.4 Strömungsverhältnisse und Schubspannung

Die Strömung des Blutes im Gefäßsystem ist verschiedenen Gesetzmäßigkeiten unterlegen.

Die Strömungsgeschwindigkeit (\bar{v}) ist bei gleichbleibender Stromstärke (I) umgekehrt proportional zum Gesamtquerschnitt (A) der entsprechenden Gefäße (Formel 1). Je höher also der Gesamtquerschnitt, desto niedriger die Strömungsgeschwindigkeit. Diese Gegebenheit erklärt den verlangsamten Blutfluss in den Kapillaren, der damit den Stoffaustausch ermöglicht.

$$\bar{v} = \frac{I}{A}$$

Formel 1: Die mittlere Strömungsgeschwindigkeit ist abhängig von Stromstärke und Gesamtquerschnitt.

\bar{v} , mittlere Strömungsgeschwindigkeit; I , Stromstärke; A , Gesamtquerschnitt

In den meisten Gefäßen herrscht laminare Strömung, allerdings kann diese bei bestimmten Bedingungen in turbulente Strömung übergehen. Dabei gilt: je geringer die Viskosität und je höher die Strömungsgeschwindigkeit, desto eher entstehen Turbulenzen (Formel 2).

Die Reynolds-Zahl (Re , dimensionslos) stellt eine physikalische Kennzahl für visköse Strömungen dar:

$$Re = \frac{2 r \bar{v} \rho}{\eta}$$

Formel 2: Übersteigt die Reynolds-Zahl den Wert 2000 kann laminare in turbulente Strömung übergehen.

Re , Reynolds-Zahl; $2r$, Durchmesser der Gefäße; \bar{v} , mittlere Fließgeschwindigkeit, ρ , Dichte; η , Viskosität.

Der Wert dieser Kenngröße steigt, je höher der Durchmesser der Gefäße ($2r$), die mittlere Fließgeschwindigkeit (\bar{v}) und Dichte (ρ) der Flüssigkeit ist und je geringer ihre Viskosität (η). Übersteigt der Wert 2000, so kann ursprünglich laminare in turbulente Strömung übergehen⁵.

Die Strömung des Blutes übt prinzipiell eine reibungsbedingte Kraft, die sogenannte Schubspannung, auf die Gefäßwände und deren Endothel aus, von der gezeigt werden konnte, dass sie Einfluss auf pathobiologische Prozesse und vaskuläres *Remodeling* nimmt⁶. Hohe Schubspannung induziert dabei unter anderem über die Expression von anti-atherogenen Proteinen wie endothelialer Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) einen atheroprotektiven endothelialen Phänotyp, wohingegen geringe Schubspannung zu endothelialer Dysfunktion führt^{7,8} und daher atherosklerotische Plaques vor allem in Bereichen mit geringer Schubspannung entstehen^{6,8,9}(Abb.3). Endothelzellen (ECs), die turbulenter Strömung ausgesetzt sind, zeigen einen pro-inflammatorischen Phänotyp, der durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF-κB oder Aktivator Protein-1 (AP-1), sowie durch Expressierung bestimmter Oberflächenmoleküle gekennzeichnet ist⁷.

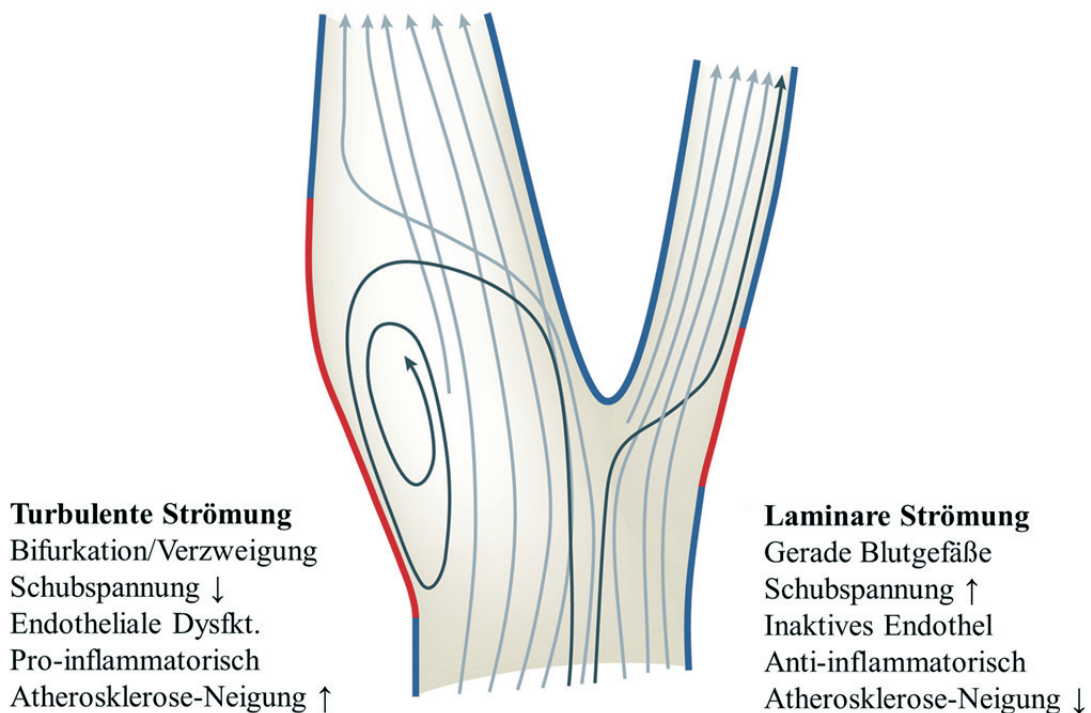


Abb. 3: Strömungsverhältnisse an vaskulären Bifurkationen und in geraden Blutgefäßen. (modifiziert nach¹⁰)

In geraden Gefäßen herrscht ein laminarer, gerichteter Blutfluss, während es an Bifurkationen oder Abzweigungen von Gefäßen zu turbulenter Strömung kommt, deren Richtung variieren kann. Dadurch wirken unterschiedliche Schubkräfte auf die jeweiligen Endothelzellen (ECs). Bei laminarer Strömung zeigen ECs einen inaktiven, anti-inflammatorischen Phänotyp und dadurch bedingt eine geringe Neigung zu Atherosklerose. Turbulente Strömung und damit niedrige Schubspannung führen hingegen zu endothelialer Dysfunktion, einem pro-inflammatorischen EC-Phänotyp und erhöhter Atherosklerose-Neigung.

1.2 Erkrankungen des kardiovaskulären Systems

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems und sekundär daraus entstehende Krankheiten zählen laut Studien der WHO (*World Health Organization*) aus dem Jahre 2012 zu den Haupttodesursachen weltweit. Den ersten Platz belegte hierbei die Koronare Herzkrankheit (auch ischämische Herzkrankheit), bei der die adäquate Versorgung des Herzens durch eine meist arteriosklerotisch bedingte Verengung der Koronararterien gestört ist und es somit zur Ischämie von Teilen des Herzmuskels kommt. Infolgedessen können Begleiterscheinungen wie Herzinsuffizienz und akuter Myokardinfarkt auftreten¹¹.

1.2.1 Atherosklerose

Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine chronische, multifaktorielle, systemische Erkrankung der Arterien in deren Verlauf es durch intimale Einlagerungen von cholesterinreichen Lipoproteinen zur Bildung sogenannter atheromatöser *Plaques* kommt.

Auch wenn sie vermehrt in der westlichen Welt vorkommt, so ist die Atherosklerose dennoch keine Krankheit der Neuzeit, konnten doch im Jahre 1911 atherosklerotische und degenerative Veränderungen in Arterien von ägyptischen Mumien nachgewiesen werden^{12,13}. Seither ist diese Krankheit Gegenstand intensivster wissenschaftlicher Forschung.

1.2.1.1 Ätiologie der Atherosklerose

Atherosklerose kann sowohl auf genetische und epigenetische Veränderungen, als auch auf inflammatorische und immunologische Vorgänge innerhalb der Arterienwände zurückgeführt werden, wobei diese quantitativ klar überwiegen^{14–16}. Risikofaktoren wie beispielsweise Hypertension, Diabetes mellitus Typ 2, Zigarettenkonsum, Hyperlipoproteinämie mit vor allem erhöhtem Level an atherogenen Lipoproteinen geringer Dichte (engl. *low density lipoprotein*, LDL) und erhöhte Angiotensin II-Level im Blut können zur Entstehung der Atherosklerose beitragen^{3,17}.

1.2.1.2 Pathogenese der Atherosklerose

Im physiologischen Zustand bestehen die Arterienwände aus intaktem Endothel, dessen Eigenschaften die Adhäsion von Leukozyten verhindert. Durch genetische Veränderungen oder oben genannte Risikofaktoren kommt es initial zu einer endothelialen Dysfunktion, die durch erhöhte Permeabilität und Adhäsion von Leukozyten gekennzeichnet ist¹⁷. Dies geschieht vor allem in atherosklerotisch prädispositionierten Bereichen, in denen geringe Schubspannung bzw. turbulente Strömung herrscht (Bifurkationen, Abzweigungen) und dadurch bereits eine milde chronische Inflammation

besteht, sodass diese Gefäßwände anfälliger für transzytotische LDL-Aufnahme und Adhäsion von Leukozyten sind^{6,18–20}(Abb.4).

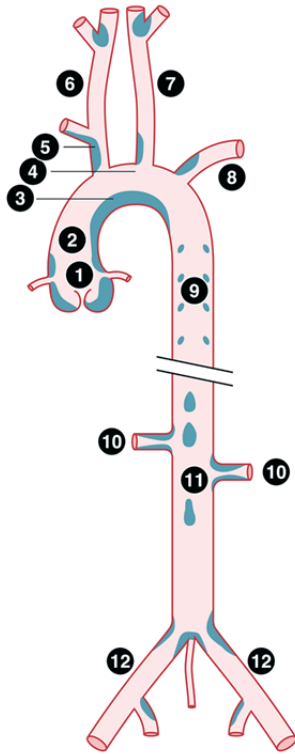


Abb. 4: Atherogenese findet vor allem an Bifurkationen und Abzweigungen statt²¹.

Hier ist das Schema des arteriellen Blutgefäßsystems von Mäusen gezeigt, die aufgrund genetischer Veränderungen und fettreicher Diät zu Atherosklerose neigen. In blau sind die Stellen markiert, an denen das Auftreten atherosklerotischer Plaques beobachtet werden konnte. 1, *Sinus aorticus*; 2, *Aorta ascendens*; 3, innere Kurve des *Arcus aortae*; 4, äußere Kurve des *Arcus aortae*; 5, *Truncus brachiocephalicus*; 6, *Arteria carotis communis sinistra*; 7, *Arteria carotis communis dextra*; 8, *Arteria subclavia sinistra*; 9, *Aorta thoracica*; 10, *Arteria renalis*; 11, *Aorta abdominalis*; 12, *Arteria iliaca*

Endothelzellen reagieren hierbei, indem sie pro-inflammatorische Substanzen (Zytokine) produzieren, die eine chemotaktische Wirkung auf bestimmte Leukozyten haben. Zusätzlich ändern ECs die Zusammensetzung ihrer Oberflächenmoleküle und exprimieren spezielle Adhäsionsmoleküle (VCAM-1, ICAM-1, MCP-1), die an entsprechende Liganden auf Monozyten und Lymphozyten binden, sodass das *Rolling* dieser Immunzellen ermöglicht wird^{17,22,23}. Durch Leukodiapedese gelangen die Zellen in den subendothelialen Raum (Abb.5B). Dort wird durch das lokale Milieu und damit einhergehend durch Interaktion mit lokal vorliegenden Faktoren (Chemokine, Zytokine, Wachstumsfaktoren) die Differenzierung von Monozyten zu Gewebsmakrophagen initiiert^{24,25}.

Je nach vorangegangenen Stimulus differenzieren Makrophagen innerhalb der *Plaques* zu einem pro-inflammatorischen M1- oder anti-inflammatorischen M2-Typ²⁶. M1-Makrophagen nehmen über sogenannte *Scavenger*-Rezeptoren (SR-A, CD36) die in der Arterienwand eingelagerten, modifizierten LDL auf^{27,28}. Aufgrund des fehlen-

den intrazellulären Feedback-Mechanismus über beispielsweise den Cholesterin-Gehalt der Zelle, wird dieser Prozess nicht unterbrochen und die Makrophagen entwickeln sich schließlich zu Schaumzellen^{18,29}(Abb.5B). Diese sind durch einen hohen Lipidgehalt in Form von in intrazellulären Lipidvakuolen eingelagertem, verestertem Cholesterin gekennzeichnet und produzieren pro-inflammatorische Moleküle und Faktoren, die das Entzündungsgeschehen durch Aktivierung von weiteren Monozyten, T-Lymphozyten, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten aufrechterhalten^{17,20,30–32}.

Während der Atherogenese kommt es zusätzlich zu Migration und Proliferation glatter Muskelzellen aus der *Tunica media* in die Intima³. Dort produzieren SMCs extrazelluläre Matrix, bestehend aus interstitiellem Kollagen, Elastin und Proteoglykanen und bilden zusammen mit diesen Substanzen eine fibröse Plaquekappe, die den Schaumzellen aufliegt³(Abb.5C). Durch Apoptose und Nekrose der lipidbeladenen Makrophagen und unzureichende Efferozytose des Zelldebris durch Phagozyten kommt es zur Ansammlung von extrazellulären Fetten und unter der fibrösen Kappe bildet sich ein fetthaltiger nekrotischer Kern^{3,26,33}(Abb.5D).

Die von mononukleären Phagozyten produzierten proteolytischen Substanzen, wie beispielsweise Kollagenasen, bauen die von SMCs hergestellte extrazelluläre Matrix ab, die normalerweise den *Plaque* stabilisiert. Die fibröse Kappe wird dadurch im Verlauf dünner und kann leichter rupturieren^{17,34}. Dieser Prozess wird durch von T-Lymphozyten innerhalb des *Plaques* produziertem Interferon- γ (IFN- γ) unterstützt, einem Zytokin, das unter anderem die Kollagen-Produktion in SMCs hemmt³⁴.

Makrophagen produzieren zu den Gerinnungsfaktoren gehörendes Gewebethromboplastin (Gewebefaktor), ein wichtiges Protein für die Initiation der Gerinnungskaskade^{31,32,34}. Kommt es im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose zu stark verdünnten fibrösen Plaquekappen, können diese aufbrechen, wodurch die verschiedenen Komponenten des Blutes mit Gewebethromboplastin und Lipiden innerhalb des *Plaques* in Berührung kommen³². Als Folge bildet sich ein Thrombus, der im weiteren Verlauf abschwemmen und zum Verschluss von distalen Gefäßen führen kann³(Abb.5D).

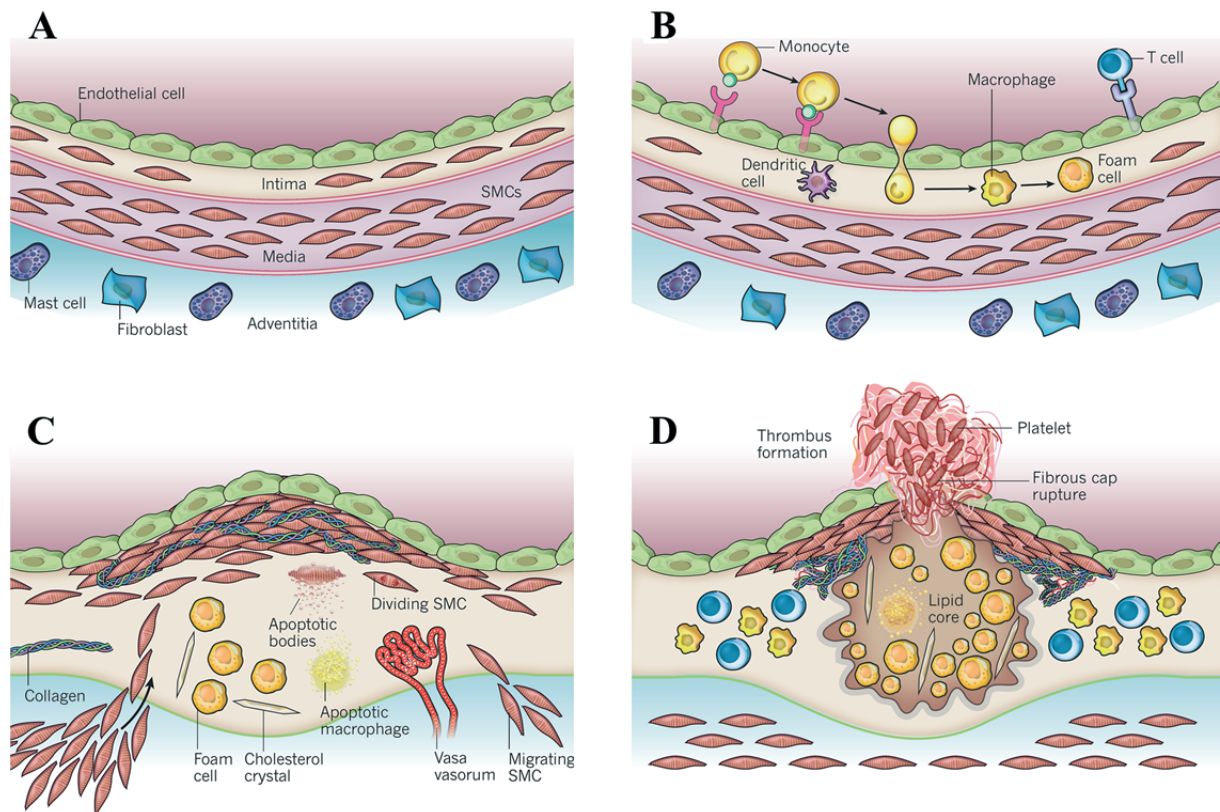


Abb. 5: Unterschiedliche Phasen in der Entstehung atherosklerotischer Plaques³.

(A) Gesunde Arterienwand bestehend aus Intima mit intaktem, das *Rolling* von Immunzellen vermeidendem Endothel, Media, bestehend aus glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix und die hauptsächlich bindegewebige Adventitia, die neben Mastzellen auch Nervenendigungen und die *Vasa vasorum* enthält. (B) Initial führt die endotheliale Dysfunktion zum *Rolling* von Monozyten, die im subendothelialen Raum zu Makrophagen differenzieren, die wiederum dort gelagerte Lipide aufnehmen und dadurch zu Schaumzellen werden. (C) Im weiteren Verlauf der Atherogenese kommt es zur Migration von SMCs aus der *Tunica media* in die *Tunica intima*, wo sie proliferieren und extrazelluläre Matrix (Kollagen, Elastin, Proteoglykane) produzieren. Durch Apoptose von Makrophagen und SMCs sammeln sich Zelldebris und Lipide unter der von SMCs gebildeten Kappe an. (D) Weit fortgeschrittener *Plaque* mit Ruptur der fibrösen Kappe und infolgedessen Thrombusbildung durch Kontakt zwischen Blutkomponenten und Gewebefaktoren.

1.2.1.3 Rolle der Immunzellen und der Milz in der Atherogenese

Bei den Immunzellen in atherosklerösen *Plaques* handelt es sich vor allem um Makrophagen, die die quantitativ größte Zellfraktion bilden. Aber auch andere Immunzellen, wie T- und B-Lymphozyten, sowie neutrophile Granulozyten, wandern während der Atherogenese in die *Plaques* ein.

Makrophagen zeigen innerhalb der *Plaques* je nach Stimulus eine Heterogenität und nehmen je nach Phänotyp unterschiedliche Rollen in der Atherogenese ein³⁵. Die T-Lymphozyten sind den Makrophagen zwar zahlenmäßig unterlegen, spielen aber ebenfalls eine wichtige Rolle in der Orchestrierung der Atherogenese, da sie die Inflammation als CD4+ T-Lymphozyten über die Produktion von IFN- γ verstärken oder als regulatorische T-Lymphozyten zu ihrer Einschränkung beitragen^{17,36,37}. B-Lymphozyten stellen die quantitativ kleinste Zellart in den atheromatösen *Plaques* dar und können je nach Typ verschiedene pro- oder anti-inflammatorische Funktionen ausüben¹⁷.

In der Milz, dem größten lymphatischen Organ, finden unter anderem Speicherung, Proliferation, Differenzierung und Sekretion der Zellen des adaptiven (T- und B-Zellen) und angeborenen Immunsystems (Monozyten, Makrophagen) und die Immunantwort auf im Blut befindliche Antigene (auch ox-LDL Antigene) statt, weshalb sie eine zentrale Rolle in der Immunantwort der Atherogenese spielt³⁸. Weiterhin konnten Nahrendorf und Kollegen 2012 zeigen, dass die Milz nach akutem Myokardinfarkt hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aufnimmt und nach dortiger, extramedullärer Monozytopoese große Mengen an Monozyten in die Peripherie entlässt, die ihrerseits wiederum die Atherosklerose beschleunigen³⁹(Abb.6). Die Milz spielt somit eine wichtige Rolle als Vermittler der Immunreaktion der Atherosklerose, nicht nur während der primären Atherogenese, sondern auch im weiteren Verlauf, beispielsweise nach Myokardinfarkt.

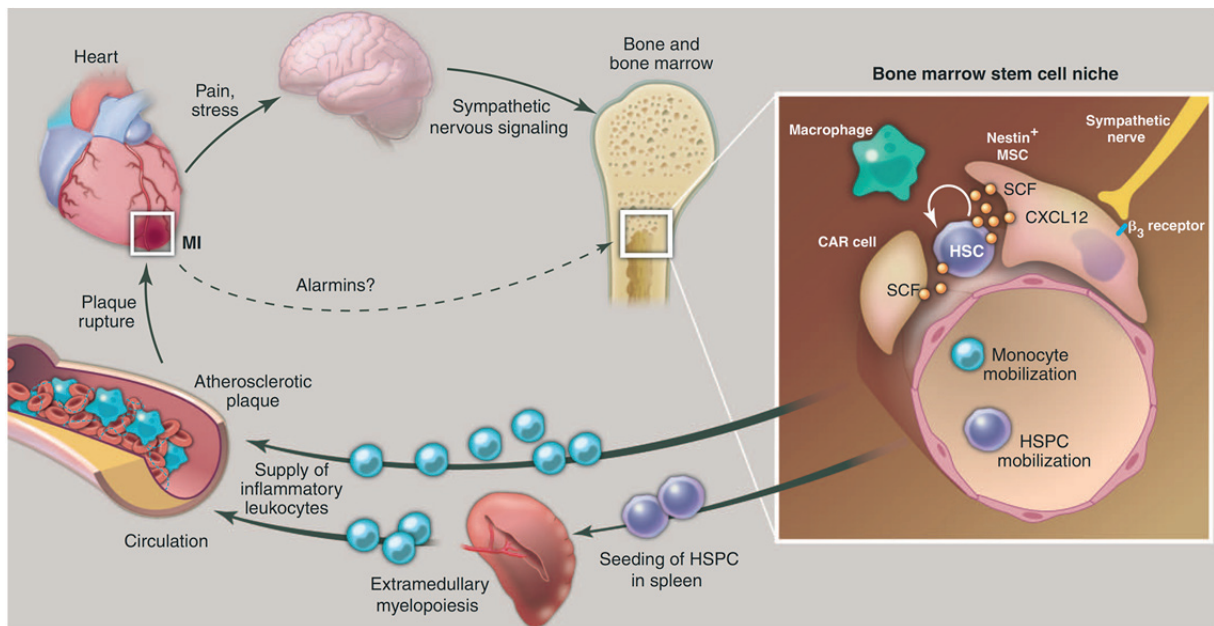


Abb. 6: Von Nahrendorf *et al.* gezeigtes Konzept, wie akuter Myokardinfarkt Atherosklerose beschleunigt^{39,40}.

Plaqueruptur führt hier zu einem akuten Myokardinfarkt, der durch Schmerz oder innere Unruhe die Aktivität des Sympathikus erhöht. Induziert durch die β_3 -Adrenorezeptor-vermittelte Noradrenalinwirkung auf Zellen der Stammzellnische des Knochenmarks, erfolgt letztlich die Ausschüttung von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs), sowie Monozyten. Für die extramedulläre Myelopoese besiedeln die HSPCs die Milz, aus der die Monozyten bei Bedarf in großer Zahl freigesetzt werden können, was wiederum Atherosklerose in den Gefäßen beschleunigt. CXCL12, CXC-Motiv-Chemokin-Ligand 12; HSC, *hematopoietic stem cell*, hämatopoetische Stammzelle; MI, *myocardial infarction*, Myokardinfarkt; MSC, *mesenchymal stem cell*, mesenchymale Stammzelle; SCF, *stem cell factor*, Stammzellfaktor.

1.2.1.4 Folgen der Atherosklerose

Durch die Rekrutierung von SMCs während der Atherogenese und der damit verbundenen erhöhten Wandstarre kommt es zum Elastizitätsverlust der Arterien. Im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose führen die *Plaques* als raumfordernde Strukturen zu Stenosen der Arterien und damit zu verminderter Perfusion von Organen (Ischämie) und einer erhöhten Nachlast des Herzens³². Nach Ruptur eines *Plaques* und Abschwemmung des Thrombus kann es als Folge beispielsweise zum zerebralen Insult, aber auch zum akuten Myokardinfarkt kommen⁴¹.

1.2.2 Akuter Myokardinfarkt

Der akute Myokardinfarkt stellt eine der Haupttodesursachen weltweit dar⁴². Er entsteht durch den thrombotischen Verschluss einer Koronararterie, wodurch es im nachgeschalteten Gewebe zur Ischämie kommt, die zu Apoptose und Nekrose von Kardiomyozyten und anderen Zellen des Myokards, wie Fibroblasten und Endothelzellen führt. Da das Herz hochgradig sauerstoffabhängig ist (35% des Zellvolumens = Mitochondrien), wirkt sich die durch Ischämie entstandene Hypoxie drastisch aus. Durch mechanische, molekulare und genetische Faktoren kommt es zum pathologischen *Remodeling* des linken Ventrikels, wovon Ventrikelgröße, -form und -funktion betroffen sind⁴³. Der Verlust eines Teils des Myokards und die versuchte Kompensation akut erhöhter Belastung, führen zu Umwandlungen wie Hypertrophie, Dilatation und Fibrose. Das *Remodeling* kann Wochen bis Monate andauern und dient dem Ausgleich zwischen Anforderung an das Herz und dessen Belastbarkeit⁴³.

Vor allem in der frühen Phase des *Remodeling* kommt es zu einer starken Inflammation in und um das Infarktgebiet, denn destruiertes Gewebe muss abgebaut und neues, das Herz stabilisierende Gewebe, aufgebaut werden. Durch das akute Eintreten der Ischämie und Hypoxie kommt es zunächst zu einer rapiden Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Gewebe, die phagozytierende, aber auch pro-inflammatorische Eigenschaften haben⁴⁰. Außerdem werden zeitnah pro-inflammatorische Monozyten (Ly-6C^{high}) rekrutiert, die zudem ebenfalls phagozytierend wirken. Um das nekrotische Gewebe enzymatisch aufzulösen, schütten sie Proteasen aus und verstärken unter anderem über die Sekretion des Zytokins Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) die Inflammation (Abb.7). Etwa 7 Tage nach Infarkt werden zunehmend anti-inflammatorische Monozyten (Ly-6C^{low}) aus dem Blut rekrutiert, die über die Sekretion der Wachstumsfaktoren *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *transforming growth factor*- β (TGF- β) Angiogenese und die Synthese neuer extrazellulärer Matrix anregen und so zur Reparatation beitragen können⁴⁰(Abb.7). Letztlich resultiert der akute Myokardinfarkt in einer Fibrose und verringerter Herzleistung, die auf Dauer zur Dekompensation und damit zum Herzversagen führen kann.

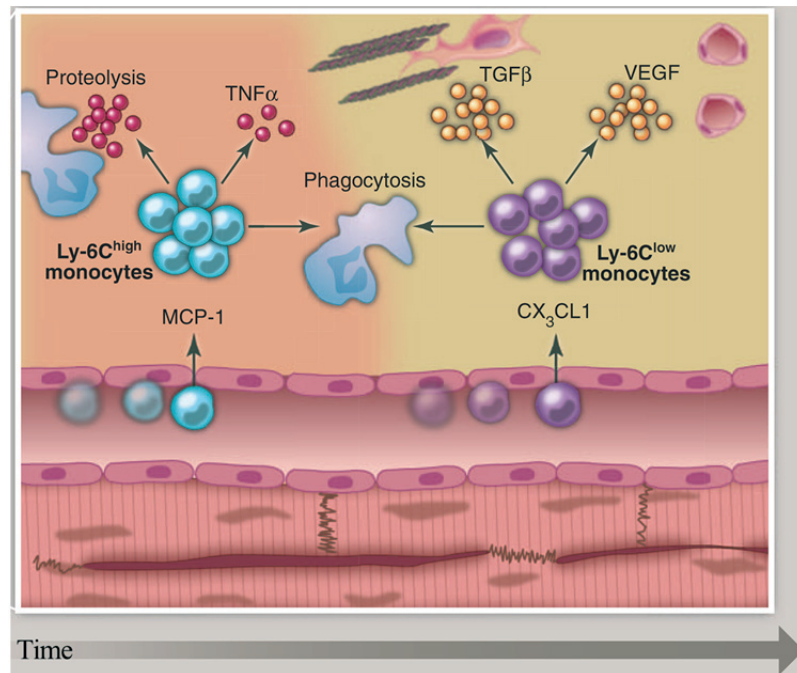


Abb. 7: Zweiphasige Monozytenrekrutierung und -differenzierung während kardialen *Re-modeling* nach akutem Myokardinfarkt⁴⁰.

In der ersten Phase nach akutem Myokardinfarkt werden vor allem pro-inflammatorische Monozyten (Ly-6C^{high}) rekrutiert, die Proteasen und TNF-α sekretieren. In der zweiten Phase, die nach ca. 7 Tagen beginnt, werden zunehmend anti-inflammatorische Monozyten (Ly-6C^{low}) rekrutiert, die über Sekretion von VEGF und TGF-β Angiogenese und die Synthese neuer extrazellulärer Matrix anregen. CX₃CL1, CX₃C-Motiv-Chemokin-Ligand 1; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1, Monozyten-Chemoattraktorprotein-1; TGF-β, transforming growth factor-β, transformierender Wachstumsfaktor-β; TNF-α, Tumornekrosefaktor-α; VEGF, vascular endothelial growth factor, Endothelwachstumsfaktor.

1.3 Nicht-kodierende RNAs

Seit Abschluss des Humangenomprojektes im Jahre 2003 stand fest, dass, obwohl ein Großteil des Genoms transkribiert wird, lediglich 1-2% des gesamten humanen Genoms für Proteine kodieren, während die restlichen 98-99% jahrzehntelang als „Schrott“-DNA galten^{44,45}. Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurde jedoch die heterogene Gruppe der nichtkodierenden RNAs (engl. *noncoding* RNAs, ncRNAs) entdeckt. Diese besteht zum größten Teil (60-70%) aus ribosomaler RNA (rRNA), die an dem Aufbau von Ribosomen beteiligt ist, sowie aus Transfer-RNA (tRNA), die bei der Translation die entsprechende Aminosäure zum Ribosom transferiert. Die nichtkode-

renden RNAs können prinzipiell in zwei Gruppen eingeteilt werden, in die langen (engl. *long noncoding* RNAs, lncRNAs) und in die kurzen (engl. *small noncoding* RNAs, sncRNAs) nichtkodierenden RNAs. LncRNAs sind > 200 Nukleotide (nt) große, maßgeblich an Genom- und Genregulation beteiligte RNAs⁴⁶. SncRNAs sind entsprechend < 200 nt lang und können in verschiedene Subgruppen unterteilt werden, wie *microRNAs* (miRs), *piwi-interacting* RNAs (piRNAs), kleine interferierende RNAs (engl. *small interfering* RNAs, siRNAs), kleine nukleoläre RNAs (engl. *small nucleolar* RNAs, snoRNAs), kleine nukleäre RNAs (engl. *small nuclear* RNAs, snRNAs) und tRNAs (Abb.8).

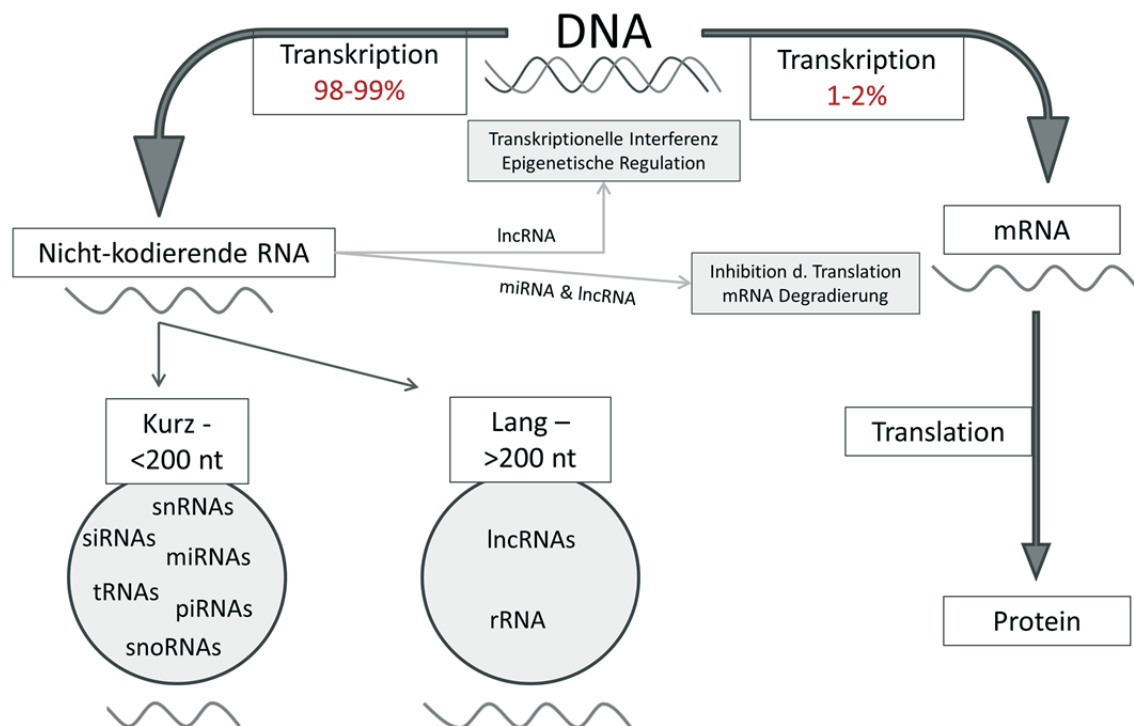


Abb. 8: Kodierende und nichtkodierende RNAs.

1-2% der DNA werden durch Transkription in mRNA umgeschrieben, die ihrerseits für bestimmte Proteine kodiert, die viele verschiedene Prozesse eines jeden Organismus steuern. Der Großteil der DNA kodiert nicht für Proteine, sondern kann in sogenannte nichtkodierende RNAs umgeschrieben werden, die ihrerseits interferierende Auswirkungen auf DNA und mRNA haben können. Die nicht-kodierenden RNAs können in lange und kurze RNAs unterteilt werden. lncRNAs, *long non-coding RNAs*; miRNAs, *microRNAs*; piRNAs, *piwi-interacting RNAs*; rRNAs, *ribosomal RNAs*; siRNAs, *small interfering RNAs*; snoRNAs, *small nucleolar RNAs*; snRNAs, *small nuclear RNAs*; tRNAs, *transfer-RNAs*

1.4 MicroRNAs

MiRs sind evolutionär hoch konservierte, 18-22 nt lange, nichtkodierende RNAs, die von allen eukaryotischen Zellen hergestellt werden und posttranskriptionell die Genexpression regulieren können. Hierbei ist von besonderem Interesse, dass eine einzige miR viele verschiedene Gene und damit unterschiedliche *Pathways* regulieren kann, da sie mit unvollständiger Komplementarität an die mRNA des Zielgens binden können⁴⁷. Nachdem die ersten miRs 1993 von der Arbeitsgruppe um Victor Ambros im Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) entdeckt wurden⁴⁸, sind bis heute in der bioinformatischen Datenbank „*miRBase*“ ca. 2500 humane miRNAs bekannt, deren Funktionen noch nicht in vollem Umfang erforscht wurden⁴⁹.

Die für miRs kodierenden Bereiche der DNA können als unabhängige Einheiten oder auch innerhalb von Introns vorliegen⁵⁰. Das jeweilige miR-Gen wird im Nukleus meist durch RNA-Polymerase II transkribiert, wodurch zunächst das primäre miR-Transkript (pri-miR) entsteht. Dieses Transkript weist eine charakteristische Haarnadelstruktur auf, welche die miR-Sequenz enthält (Abb.9). Im nächsten Schritt wird dieses Transkript von dem RNase III-Protein (Drosha) so prozessiert, dass die 70-80 nt lange Vorläufer-miR entsteht (pre-miR)⁵¹. Über Exportin-5 wird die pre-miR dann vom Nukleus in das Zytoplasma transportiert, wo sie von einer weiteren RNase III (Dicer) in einen 20-25 nt langen miR-Duplex geschnitten wird. Dieser Doppelstrang wird in zwei Einzelstränge geteilt, den Hauptstrang (engl. *guiding strand*) und den Gegenstrang (engl. *passenger strand*), der normalerweise degradiert wird. Der miR-Hauptstrang wird, gemeinsam mit Argonautenprotein 2 (Ago2, Endonuklease), in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) geladen, der dadurch aktiviert und zur entsprechenden Zielgen-mRNA geleitet wird. Diese wird daraufhin je nach Komplementarität von miR und mRNA entweder in der Translation gehemmt, zerschnitten oder deadenyliert, wodurch sie anfällig für Exonukleasen wird. Auf diese Weise sind miRs in der Lage die Genexpression verschiedenster *pathways* zu regulieren^{50,52} (Abb.9).

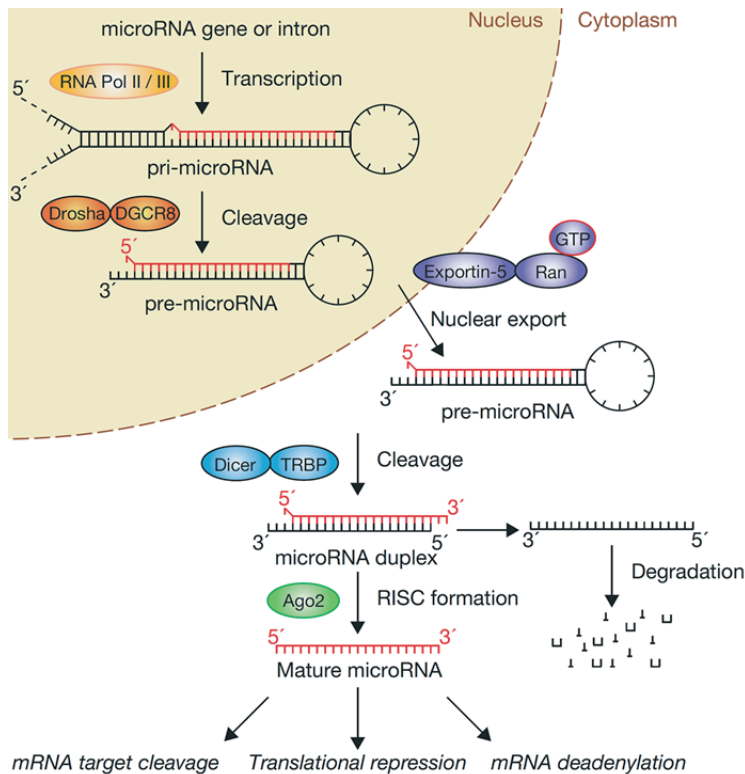


Abb. 9: Klassische Biogenese von microRNAs⁵².

Durch Transkription des miR-Gens per Polymerase II wird die primäre miR (pri-miR) gebildet, die von Drosha-DGCR8 geschnitten wird, sodass die Vorläufer-miR (pre-miR) entsteht. Sie gelangt über den Exportin 5-Ran-GTP Komplex ins Zytoplasma, wo sie von Dicer-TRBP in einen miR-Duplex geschnitten wird, der sich dann in Haupt- und Nebenstrang (wird degradiert) teilt. Der Hauptstrang wird zusammen mit Ago2 in den RISC geladen und kann dadurch an die Zielgen-mRNA binden. Diese wird anschließend entweder in der Translation gehemmt oder

degradiert.

1.4.1 Funktionen von miRNAs

MiRs regulieren viele verschiedene Prozesse wie Entwicklung, Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Metabolismus und Zellalterung und spielen dadurch im physiologischen Zustand, aber auch in der Pathophysiologie diverser Krankheiten eine entscheidende Rolle⁵⁰. Außerdem können miRs als Biomarker dienen und somit helfen, Erkrankungen frühzeitig zu erkennen⁵³.

Eine einzelne miRNA kann die Expression von verschiedenen Genen innerhalb eines, aber auch innerhalb mehrerer biologischer Prozesse regulieren (Abb.10). Diese Regulation entspricht immer einer Hemmung, da die Konsequenz aus miR-mRNA Interaktion in einer verminderten Translation der mRNA resultiert. Durch die Orchestrierung und das Zusammenspiel mehrerer miRs können viele biologische Prozesse auf komplexe Weise reguliert werden. (Abb.10).

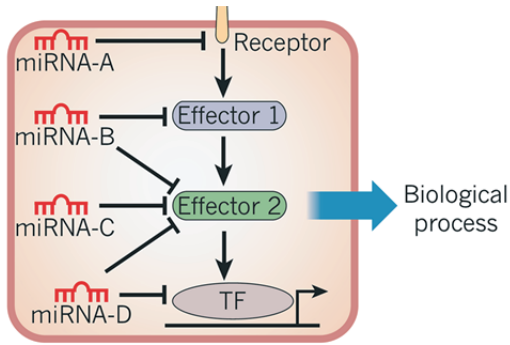


Abb. 10: MicroRNAs hemmen verschiedenste Rezeptoren, Effektoren und Transkriptionsfaktoren und regulieren so diverse biologische Prozesse⁵⁴.

Eine einzelne miR kann viele Zielgene haben und unterschiedliche miRs können somit Einfluss auf denselben Prozess nehmen, was die Komplexität ihrer Funktionen unterstreicht.

Die Funktionen von endogenen miRs kann man sich zunutze machen, indem man ihre Expression innerhalb verschiedener Gewebe oder ganzer Organismen moduliert⁵⁴. Die Überexpression von miRs kann über chemisch synthetisierte, doppelsträngige Oligonukleotide (engl. *miR mimics*) erreicht werden. Sie bestehen aus einem Nebenstrang und einem miR-Strang, der dieselbe Sequenz hat wie die spezifische miR und somit gegen dieselben mRNAs gerichtet ist. Einzelsträngige Oligonukleotide (AntimiRs), die komplementär an miRs binden, können diese dadurch inhibieren. Möchte man eine bestimmte mRNA vor Degradierung durch miR-Bindung schützen, so kann man die mRNA durch komplementär bindende Oligonukleotide (engl. *target mask*) maskieren. Des Weiteren gibt es natürliche und synthetische RNAs, die als miR-Schwamm fungieren, indem sie miRs kompetitiv an sich binden und so an ihrer Funktion hindern⁵⁵(Abb.11).

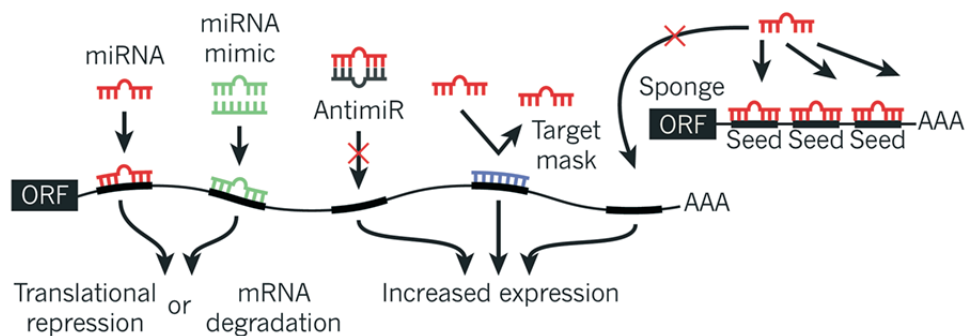


Abb. 11: Modulation der microRNA-Aktivität und -Expression durch Oligonukleotide⁵⁴.

MiRs (rot) binden im Normalfall an teilweise komplementäre Sequenzen auf der Zielgen-mRNA (schwarz). Über miRNA mimics (grün) kann eine Überexpression der gewünschten miR erreicht werden, wohingegen AntimiRs die jeweilige miR inhibieren. *Target mask* Oligonukleotide maskieren die mRNA, sodass miRs nicht binden können. Natürliche und synthetische RNAs können als miR-Schwämme fungieren, die miRs binden und so in ihrer Funktion hemmen.

1.4.2 MicroRNAs im kardiovaskulären Bereich

miRNAs und ihre Regulation unterschiedlichster *Pathways* spielen eine große Rolle in der Physiologie des Herzens sowie in diversen kardiovaskulären Erkrankungen. Physiologische Vorgänge am Herzen, wie embryonale Entwicklung, Differenzierung oder Herzregeneration, aber auch pathologische Vorgänge, wie die Entwicklung von kardialer Hypertrophie, Fibrose oder Arrhythmien können von miRNAs reguliert werden (Abb.12).

Beispielsweise zeigten Versuche in denen miR-1-2 deletiert wurde, deren Einfluss auf Vorgänge während der embryonalen Herzentwicklung, wie kardiales Wachstum, Differenzierung, elektrische Weiterleitung oder Regulation des Zellzyklus^{56,57}. Auch für miR-133a und die miRNA-17-92-Gruppe konnte nachgewiesen werden, dass sie in die embryonale kardiale Entwicklung involviert sind. miR-133a hemmt dabei die Proliferation von Kardiomyozyten und führt dadurch bei Überexpression zu embryonaler Letalität, wohingegen Mausembryos, denen die miR-17-92-Gruppe fehlte, einen ventrikulären Septumdefekt aufwiesen⁵⁷. MiR-1 ist weiterhin im Zusammenspiel mit miR-133, -208 und -499 in der Lage, Fibroblasten in Kardiomyozyten umzuprogrammieren und so zur Regeneration beizutragen. Dieser Prozess konnte nach Injektion der miRs in ischämisches Myokard von Mäusen *in situ* beobachtet werden⁵⁷.

Die transgene Überexpression von miR-208a im Herzen induzierte kardiale Hypertrophie in Mäusen, wohingegen die Inhibierung von miR-208a zu einer Verbesserung der Herzfunktion in Ratten mit Herzinsuffizienz führte⁵⁷.

Kardiale Hypertrophie kann die miR-Expression des Herzens modulieren, und es finden sich dabei meist reduzierte Level an miR-150. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von miR-150 und miR-181b *in vitro* zu einer Reduktion der Kardiomyozyten-Größe führen⁵⁷.

Diese Beispiele weisen auf die mannigfaltigen Einflüsse von miRs auf die verschiedensten physiologischen und pathologischen Vorgänge in und am Herzen hin (Abb.12).

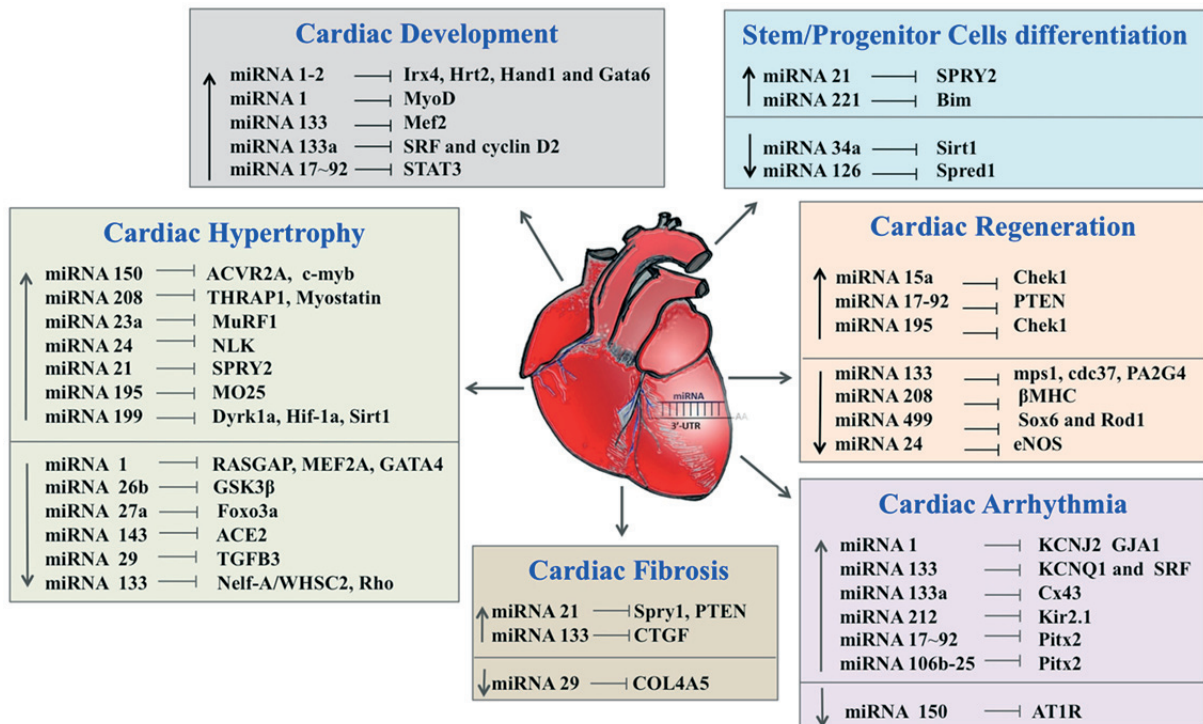


Abb. 12: Rolle von miRNAs in Physiologie und Pathophysiologie des Herzens⁵⁷.

Auswahl an miRs inklusive zugehöriger Zielgene und ihre Auswirkungen auf verschiedene kardiale Prozesse wie Entwicklung, Hypertrophie, Regeneration, kardiale Arrhythmie oder Fibrose. ↑Erhöhung
↓Verminderung

Auch im vaskulären Bereich ist die funktionelle Rolle von miRNAs vielseitig (Abb.13). MiR-126 ist als die am höchsten exprimierte miRNA in Endothelzellen beispielsweise essentiell für die Angiogenese und kann Atherosklerose über die verstärkte Rekrutierung von Progenitorzellen abschwächen⁵⁸.

MiR-92a, Mitglied der miR-17-92a-Gruppe, wirkt inhibierend auf Angiogenese und Endothelzellproliferation und damit einhergehend führt ihre Inhibierung zu gesteigerter Angiogenese und verbesserter Regeneration von beispielsweise durch Ischämie geschädigtem Gewebe^{59,60}. MiR-92a spielt zusätzlich eine Rolle in der Atherogenese, da gezeigt werden konnte, dass sie *in vivo* in Endothelzellen, die turbulenter Strömung ausgesetzt waren, stark exprimiert ist. Über die Regulation von verschiedenen Proteinen (*Krüppel-like factor 2*, Integrin-alpha V) durch miR-92a wurde dadurch letztlich die eNOS-Expression der betroffenen Endothelzellen negativ beeinflusst, wodurch diese Zellen einen atherogenen Phänotyp zeigten⁷. Dies wurde 2014 von Loyer *et al.* bestätigt, die zeigten, dass die Expression von miR-92a in Bereichen

geringer Schubspannung und gleichzeitig erhöhten oxLDL-Leveln in Endothelzellen erhöht ist und dass eine Inhibierung von miR-92a *in vivo* Atherosklerose signifikant reduzierte⁶¹.

Boettger *et al.* konnten 2009 zeigen, dass die miR-143/145-Gruppe essentiell für die Erhaltung des kontraktilen Phänotyps von arteriellen glatten Muskelzellen ist⁶². MiR-143/145^{-/-} Mäuse waren zwar lebensfähig, allerdings gab es innerhalb der arteriellen SMCs eine Verschiebung des Anteils kontraktiler, hin zu synthetischen SMCs. Damit stand fest, dass der miR-143/145-*knockout* SMCs daran hinderte ihren physiologischen kontraktilen Phänotyp anzunehmen. Dies und eine reduzierte Antwort verbleibender kontraktiler SMCs auf vasokonstriktive Reize war für eine verminderte Kontraktilität der Gefäße und damit für einen verminderten Blutdruck verantwortlich⁶². Die Arbeitsgruppe zeigte, dass miR-145 *angiotensin-converting-enzyme* (ACE, Angiotensin-konvertierendes Enzym) direkt oder indirekt reguliert, sodass die miR-143/145^{-/-} Mäuse einen erhöhten Level an membrangebundenem ACE in vaskulären glatten Muskelzellen aufwiesen und somit dauerhaft lokal erhöhten Leveln an Angiotensin II ausgesetzt waren. Dies führte letztlich zu einer Angiotensin-Resistenz. Die miR-143/145^{-/-} Mäuse neigten außerdem bei normalem Lipid-Gehalt des Blutes zu intimalen Läsionen, was unter anderem auf dauerhaft erhöhte Angiotensin II-Level zurückgeführt wurde⁶². Alles in allem zeigten diese Versuche, dass die miR-143/145-Gruppe eine anti-atherosklerotische Wirkung in vaskulären glatten Muskelzellen vermittelt.

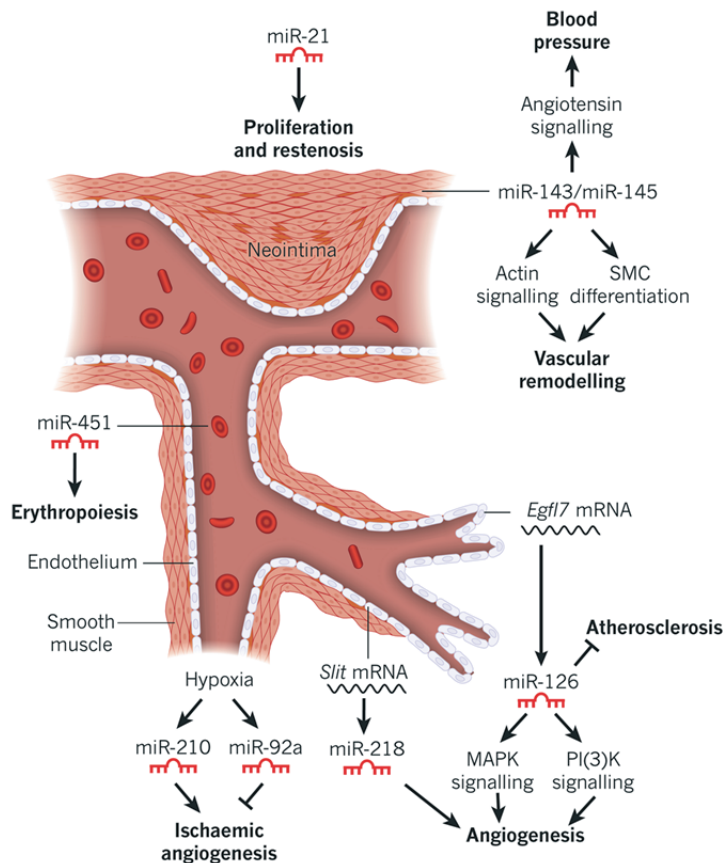


Abb. 13: Beispiele für die Funktionen von miRNAs im vaskulären Bereich⁵⁴.

Expression und Funktionen ausgewählter miRs, dargestellt an einem Blutgefäß bestehend aus einschichtigem Endothel und glatten Muskelzellen (SMCs), die nach endothelialer Läsion proliferieren.

1.5 Interzelluläre Kommunikation

Interzelluläre Kommunikation kann entweder über direkten Zell-Zell-Kontakt oder über lösliche Signalstoffe erfolgen. Früher galten Hormone und Zytokine als Hauptmediatoren der kontaktunabhängigen interzellulären Kommunikation im Organismus. Mittlerweile weiß man aber, dass unterschiedlichste biologische Signale auch über andere Trägerstoffe, wie beispielsweise extrazelluläre Vesikel (EV) oder bestimmte Transportproteine, von einer Zelle zur Anderen transportiert werden können.

1.5.1 Extrazelluläre microRNAs in interzellulärer Kommunikation

Extrazelluläre miRs sind im Blut und in fast allen anderen Körperflüssigkeiten wie Speichel, Urin, Samenflüssigkeit oder auch in Muttermilch detektierbar. Das gleichzeitige Vorliegen von diversen Ribonukleasen (RNasen)⁶³ deutet auf einen Mechanismus hin, der die miRs in der Flüssigkeit durch Bindung und/oder durch Einschluss in Lipidvesikel vor der Degradierung schützt und sie stabilisiert. Durch diese Stabilisie-

rung stellen extrazelluläre miRs verlässliche Biomarker für unter anderem kardiovaskuläre Erkrankungen dar⁶⁴. Es konnte gezeigt werden, dass es beispielsweise im Blut unterschiedliche Trägerstoffe für miRs gibt. Bisher ist bekannt, dass Lipoproteine, extrazelluläre Membranvesikel und RNA-bindende Proteine als miR-Trägerstoffe und Vermittler der interzellulären Kommunikation eine Rolle spielen⁶⁴.

HDL und in geringerem Maße LDL, die aus einer einschichtigen Lipidschicht und hydrophobem Kern bestehen, sind prinzipiell in der Lage, miRs im Plasma zu transportieren⁶⁵. Dabei konnte allerdings gezeigt werden, dass an HDL gebundene miRs nicht in ECs, SMCs und mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) transferiert werden können, was eine Regulation dieser Zellen durch HDL-gebundene miRs ausschließt. Außerdem lag bei den untersuchten miRs der in HDL transportierte Anteil unter 10% des Gesamtlevels der miRs im Plasma⁶⁵.

Weiterhin liegen miRs gebunden an 50-300 kDa große Ribonukleoproteine vor, zu denen auch Ago2 gehört. Dabei können diese miR-Ribonukleinprotein-Komplexe sowohl frei im Blutplasma vorliegen, aber auch innerhalb von Membranvesikeln transportiert werden⁶⁶.

Die dritte und größte Gruppe bisher bekannter miR-Trägersubstanzen in Körperflüssigkeiten sind die extrazellulären Vesikel, die von den meisten Zellarten produziert werden und in denen miRs innerhalb des hydrophilen Kerns eingeschlossen, von einer Doppellipidschicht umgeben und dadurch vor RNasen geschützt sind. Die EV können in 3 Subgruppen unterteilt werden, die 50-100 nm großen Exosomen, die 100-1000 nm großen Mikrovesikel (MV) und letztlich die >1 µm großen apoptotischen Körperchen (engl. *apoptotic bodies*)⁶⁷. Alle 3 Subgruppen sind in der Lage miRs zu transportieren und in andere Zellarten zu transferieren, wobei ihr miR-Profil abhängig von der jeweiligen pathophysiologischen Situation der Spenderzelle ist⁶⁴. In 2009 konnte erstmals der Transfer einer in der Zielzelle funktionell aktiven miR, der miR-126, gezeigt werden. Diese miR wurde in apoptotischen Körperchen als „Warnsignal“ von Endothelzellen zu umliegenden Endothelzellen transportiert, wodurch diese einen anti-atherosklerotischen Phänotyp zeigten⁵⁸.

2013 zeigten Zhou *et al.*, dass miR-126 eine wichtige Rolle bei der interzellulären Kommunikation zwischen ECs und SMCs spielt. Die Arbeitsgruppe konnte feststellen, dass miR-126 im Medium von ECs sowohl in von ihnen produzierten extrazellulären Vesikeln als auch gebunden an Ago2 vorlag. Für den Transfer zu SMCs waren die Vesikel in diesem Fall allerdings nicht verantwortlich, sondern es war hauptsächlich die Ago2-gebundene miR-126-Fraktion, die für die regulierte Genexpression in SMCs verantwortlich war⁶⁸.

Es wird von einem aktiven, selektiven Export von miRs aus der Spenderzelle ausgegangen, da sich das Profil exportierter miRs bei diversen Erkrankungen von dem physiologischen Export-Profil unterscheidet. Dabei ist bis heute kaum bekannt, auf welche Weise miRs selektiv exportiert werden, aber es gibt Vieles, das auf das Vorhandensein dieses Exports hindeutet. So entspricht das von einer Zelle sekretierte miR-Profil nicht zwingend dem Profil der Zelle selbst, sie sekretiert also nicht alle in ihr vorhanden miRs im gleichen Maße. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass beispielsweise Tumorzellen miRs sekretieren, die in den Ursprungszellen nicht vorhanden sind, was darauf hindeutet, dass sie speziell für den Export produziert wurden⁶⁴.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Zusammenspiel aus aktiv/selektiver Sekretion von maturen miRs durch die passenden Trägersubstanzen und dem dadurch vermittelten Schutz vor RNasen einerseits eine Gruppe stabiler und verlässlicher Biomarker darstellt und andererseits der interzellulären Kommunikation dient, bei der die miR in der Zielzelle weiterhin funktionsfähig ist und dadurch die entsprechenden Zielgen-mRNAs reprimieren kann⁶⁴(Tabelle 1). Durch die Entdeckung der im Blut durch beispielsweise EV stabilisierten miRs als zusätzliche Signalstoffe zu bis dahin bekannten Stoffen, stieg die Fülle der zwischen Zellen übermittelten Informationen und dadurch beeinflussbaren biologischen Prozesse um ein Vielfaches an.

Tabelle 1: Beispiele funktioneller miRs in interzellulärer Kommunikation⁶⁴.

Spenderzelle	Empfängerzelle	Trägerstoff	miRNA	Effekt
Endothelzellen	Endothelzellen	Apoptotische Körperchen	miR-126	Atherosklerose ↓
Monozyten	Endothelzellen	Mikrovesikel	miR-150	Migration ↑
Endothelzellen	Vaskuläre glatte	Exosomen/	miR-143	Atherosklerose ↓
	Muskelzellen	Mikrovesikel	miR-145	

1.5.2 Extrazelluläre Vesikel

Die ersten EV wurden bereits vor 30 Jahren beschrieben, allerdings ging man davon aus, dass sie keine besondere Funktion hätten. Erst Raposo *et al.* konnten 1996 zeigen, dass EV von B-Lymphozyten eine Reaktion in T-Lymphozyten auslösen konnten⁶⁹. EV können entweder auf benachbarte, oder auch auf weiter entfernte Zellen wirken. Diese Wirkung beruht unter anderem auf dem Transfer von Proteinen, Lipiden oder auch RNAs⁷⁰.

EV können wie bereits erwähnt in 3 Subgruppen unterteilt werden: apoptotische Körperchen, Mikrovesikel und Exosomen. Diese 3 Subtypen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Größe, sondern auch in der jeweiligen Biogenese. Gemeinsam ist allen die sie umgebende Doppellipidmembran mit hydrophilem Kern.

1.5.2.1 Apoptotische Körperchen

Apoptotische Körperchen sind mit bis zu 4000 nm die größten EV und lösen sich während des programmierten Zelltodes von der Plasmamembran. Dementsprechend beinhalten sie zum Teil intakte Zellorganellen, Proteine, sowie DNA, RNAs und miRs^{71,72}, die von einer phosphatidylserinreichen Lipidmembran umschlossen werden. Apoptotische Körperchen vermitteln den horizontalen Transfer der Zelltrümmer zu den Phagozyten⁷³, können aber auch von anderen Zellen aufgenommen werden. 2009 konnten Zerneck *et al.* zeigen, dass die während der Atherosklerose produzierten apoptotischen Körperchen von Endothelzellen, die unter anderem miR-126 enthielten, von benachbarten Endothelzellen aufgenommen wurden und dort durch Hemmung der miR-126-Zielgen-mRNA eine atheroprotektive Wirkung ausübten⁵⁸.

1.5.2.2 Mikrovesikel

Mikrovesikel sind 100-1000 nm große Vesikel, die durch Knospung der Plasmamembran entstehen und in der Lage sind Proteine, Rezeptoren, Lipide und funktionelle mRNAs und miRs zu diversen, benachbarten oder fernen Empfängerzellen zu transportieren^{67,72} (Abb.14). So kann, je nach Inhalt und Oberflächenmolekülen der MV, die Zielzelle beeinflusst werden. Es konnte beispielsweise 2010 von Zhang *et al.* gezeigt werden, dass von Monozyten produzierte MV miR-150 enthielten und diese zu Endothelzellen transferierten, wo sie durch Hemmung der Zielgen-mRNA zu erhöhter Migration führten⁷⁴. Des Weiteren konnten Hergenreider *et al.* zeigen, dass die in MV von laminarer Strömung ausgesetzten Endothelzellen verpackten miR-143 und -145 zu glatten Muskelzellen der Gefäßwände transferiert und einen kontraktiven, atheroprotektiven Phänotyp derselben hervorrufen konnten⁷⁵.

Cantaluppi *et al.* zeigten 2012, dass MV von endothelialen Progenitorzellen (engl. *endothelial progenitor cell*, EPC) über in ihnen transportierte miRs in der Lage waren, die durch Ischämie/Reperfusion hervorgerufenen Nierenschäden signifikant zu reduzieren⁷⁶. Dabei konnte nach Applikation von EPC-MV eine signifikante Reduktion tubulärer Läsionen, eine erhöhte Proliferationsrate von tubulären Zellen, sowie eine signifikant reduzierte Anzahl apoptotischer tubulärer Zellen beobachtet werden. Diese Effekte konnten durch Hemmung der miR-Biogenese in den Spenderzellen und deren Behandlung mit AntimiRs gegen miR-126 und -296 signifikant reduziert werden, weshalb unter anderem diese in MV transportierten miRs für die positiven Effekte auf die Nierenzellen verantwortlich sind⁷⁶.

1.5.2.3 Exosomen

Exosomen sind 50-100 nm große EV, die im Gegensatz zu den MV bereits innerhalb der Zelle in multivesikulären Endosomen (= multivesikuläre Körperchen) als intraluminalen Vesikel entstehen. Fusionieren diese Endosomen mit der Zellmembran, so werden die Exosomen freigesetzt und können ihren Inhalt zu benachbarten oder weiter entfernten anderen Zellen transferieren. Die komplexere Biogenese der Exosomen im Vergleich zu den anderen EV erlaubt eine strengere Kontrolle ihrer Zusammen-

setzung⁷⁷(Abb.14). Der genaue Mechanismus der Entstehung von multivesikulären Endosomen ist noch nicht bekannt, aber für einige Proteine, z.B. ESCRT, konnte ein Zusammenhang mit ihrer Genese nachgewiesen werden. Natürlich spielen bei der Fusion dieser Endosomen mit der Zellmembran außer Strukturen des Zytoskeletts weitere Stoffe wie bestimmte Proteine (SNARE) und diverse Rab GTPasen eine Rolle. Ebenso wie MV können Exosomen Proteine, Lipide und RNAs zu verschiedenen Empfängerzellen transportieren^{70,77}.

1.5.2.4 Aufnahme und Interaktion der extrazellulären Vesikel mit Empfängerzellen

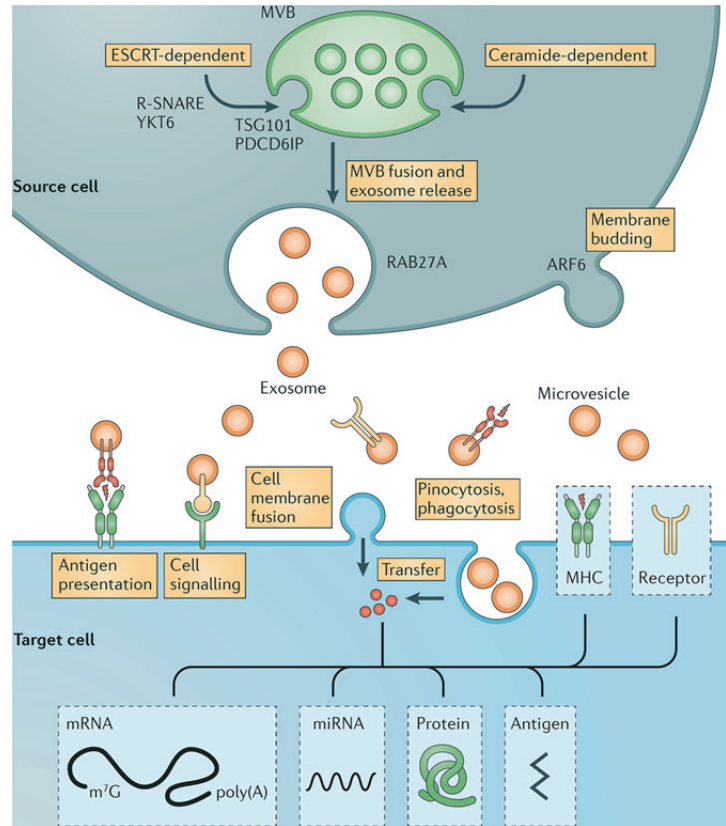
Es sind grundsätzlich 3 verschiedene Wirkungsarten von EV auf Empfängerzellen bekannt. Hierbei können entweder die Oberflächenmoleküle der Vesikel mit denen der Zielzellen interagieren, was innerhalb der Zelle verschiedene Signalkaskaden und Reaktionen wie Aktivierung oder Reduktion der Aktivität auslösen kann⁶⁷(Abb.14). Des Weiteren können EV mit der Zellmembran der Zielzelle fusionieren und dadurch ihren Inhalt direkt in das Zytoplasma freigeben, wobei gleichzeitig ihre Oberflächenmoleküle und Lipidmembran in die der Zielzelle integriert werden^{67,70,71}(Abb.14). Außerdem gibt es die Möglichkeit, dass die EV durch Pino-/Phagozytose oder rezeptor-gesteuerte Endozytose von der Empfängerzelle aufgenommen werden und der Inhalt nach Fusion der EV mit der Endosomenmembran ins Zytoplasma freigesetzt wird⁷¹.

Je nach Art und Weise des Transfers und damit je nach Inhaltsstoffen und Oberflächenmolekülen, die durch EV auf oder in die Zielzelle übertragen werden, werden dort die entsprechenden biologischen Effekte erzeugt. So können beispielsweise immunmodulierende Signale oder auch Antigene, die eine Immunantwort auslösen, übertragen werden⁷⁰. Natürlich können mRNAs und miRs ins Zytoplasma der Zielzelle transferiert werden, wo sie in funktionelle Proteine umgeschrieben werden (mRNAs) oder aber deren Produktion verhindern (miRs), was hochgradige Auswirkungen auf Phänotyp, Funktion und Verhalten der Zielzelle haben kann⁷⁰(Abb.14). Auch Tumoren bedienen sich extrazellulärer Vesikel, um beispielsweise Angiogenese

zu induzieren, Zellen zur Proliferation anzuregen oder aber T-Zellen in ihrer Aktivität zu mindern und damit der Immunantwort des Wirts auszuweichen⁷⁰.

Abb. 14: Biogenese extrazellulärer Vesikel und mögliche Interaktionen mit Zielzellen⁷⁰.

Exosomen entstehen durch nach innen gerichtete Abschnürungen der Membran der multivesikulären Körperchen (engl. *multivesicular bodies*, MVB). Dieser Prozess, sowie das Verpacken bestimmter Inhalte in die Exosomen, ist abhängig von verschiedenen Proteinen (z.B. ESCRT). Indem diese multivesikulären Körperchen mit der Zellmembran fusionieren, werden die Exosomen freigesetzt, wobei dieser Prozess von z.B. RAB27A abhängig ist. MVB entstehen durch Abschnürungen der Plasmamembran. EV können ver-



schiedene Signale und Inhalte an ihre Empfängerzellen übertragen, indem sie auf verschiedene Weise mit ihnen interagieren. Immunregulatorisch sind sie durch Präsentation oder Übertragung von Antigenen oder MHC-Proteinen wirksam, aber sie können die Zielzelle auch direkt aktivieren, indem sie Rezeptoren übertragen oder an Rezeptoren binden und dadurch eine Signalkaskade innerhalb der Zelle auslösen. Werden sie aufgenommen und ihr Inhalt freigesetzt, so sind sie in der Lage infektiöse Partikel, Transkriptionsfaktoren, aber auch mRNA und miRNA zu transferieren, die ihrerseits Einfluss auf biologische Prozesse innerhalb der Zelle nehmen. ARF6, *ADP-ribosylation factor 6*; ESCRT, *endosomal sorting complex required for transport*; MHC, *major histocompatibility complex*; PDCD6IP, *programmed cell death 6 interacting protein*; SNARE, *soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptor*; TSG101, *tumor susceptibility gene 101 protein*.

1.6 Ziel der Arbeit

Seit ihrer Entdeckung vor 30 Jahren wurden den extrazellulären Vesikeln (Apoptotische Körperchen, Mikrovesikel, Exosomen) immer mehr Funktionen in interzellulärer Kommunikation zugeschrieben. So fand man heraus, dass sie unter anderem dazu dienen, unterschiedliche Inhalte wie Proteine, Rezeptoren, Lipide, aber auch funktionelle mRNAs und miRs zwischen benachbarten oder weiter entfernten Zellen zu transferieren.

Unsere Arbeitsgruppe konnte 2012 bereits zeigen, dass Endothelzellen, die laminarer Strömung ausgesetzt waren, die von ihnen produzierten Mikrovesikel verstärkt mit miR-143/145 beladen und dass dieser Prozess durch den Transkriptionsfaktor *Krüppel-like factor 2* (KLF2) vermittelt wurde. Nach dem Transfer dieser Mikrovesikel zu vaskulären glatten Muskelzellen zeigten diese einen kontraktilen, atheroprotektiven Phänotyp⁷⁵. Wurden die Vesikel im Atherosklerose-Modell injiziert, konnte dadurch die Gesamtfläche atherosklerotischer Läsionen der Aorta signifikant reduziert werden⁷⁵.

Von besonderem Interesse für meine Arbeit war daher, ob Mikrovesikel eine Option für den Transport therapeutisch wirksamer miRs zwischen gleichen und unterschiedlichen Zellarten darstellen und welchen Einfluss die KLF2-Expression der Mikrovesikel-Spenderzellen auf diese interzelluläre Kommunikation nimmt. Dies sollte am kardiovaskulären System untersucht werden, weswegen Endothelzellen als Spenderzellart verwendet wurden, da sie die Innenwände aller Gefäße auskleiden und im physiologischen, aber auch im pathologischen Zustand Mikrovesikel unterschiedlichen Inhalts produzieren und diese direkt in das Blut abgeben können.

Im Verlauf dieser Doktorarbeit sollten also folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Sind Mikrovesikel von Endothelzellen prinzipiell in der Lage, die in ihnen verpackte miR *in vitro* zu unterschiedlichen Empfängerzellen zu transportieren, gibt es dabei quantitative Unterschiede und wird dieser Prozess durch KLF2-Expression in den Mikrovesikel-Spenderzellen reguliert?

2. Kann die in Mikrovesikeln von normalen oder KLF2-überexprimierenden Endothelzellen verpackte miR auch nach intravenöser Injektion *in vivo* in unterschiedlichen Geweben detektiert werden?
3. Wird dieser Transfer und die Aufnahme der Vesikel *in vivo* nach Aktivierung der Gewebe durch das akute Myokardinfarkt-Modell und das Atherosklerose-Modell verstärkt und falls ja, welches Gewebe zeigt die höchste Aufnahmerate?
4. Sind die von Hergenreider *et al.* gezeigten positiven biologischen Effekte der Mikrovesikel auf diese Aufnahme zurückzuführen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien und Hersteller.

Gegenstand	Hersteller
BD Falcon™ (FACS-Röhrchen)	BD Biosciences, Franklin Lake, NJ (USA)
CD14 MicroBeads, human + LS columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Ceramic spheres (6,35 mm)	MP Biomedicals, Solon, OH (USA)
Chirurgisches Nahtmaterial: 6-0, BV-1, Ethicon 8-0, BV-130-5, Ethicon	Ethicon (Johnson&Johnson), Livingston (Schottland)
Combitips (0,2 ml, 0,5 ml, 1,0 ml, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml)	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Corning Costar Stripette, serologische Stripetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Deckgläschen Falcons (15 ml, 50 ml)	Applied Biosystems, Foster City, CA (USA) Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
Foliodress® mask Injekt® (Spritzen, 2, 5, 10, 20 ml)	Paul Hartmann AG, Heidenheim (Deutschland) B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
MaiMed® - Tip Cotton Applicators Microlance™ 3 Kanüle (30, 27, 24, 21 G)	MaiMed GmbH, Neuenkirchen (Deutschland) BD Biosciences, Franklin Lake, NJ (USA)
Mikro-Schraubröhre 2 ml MircoAMP® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (Deutschland) Applied Biosystems, Foster City, CA (USA)
NucleoCassette für NucleoCounter Objektträger	Chemometec, Allerød (Dänemark) Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA (USA)
Pasteurpipette, glas	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)

Peha-soft® nitrile	Paul Hartmann AG, Heidenheim (Deutschland)
Pipettenspitzen mit Filter (Filter Tips TipOneRPT 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Starlab, Hamburg (Deutschland)
Plastipak™ Spritzen, 1 ml	BD Biosciences, Franklin Lake, NJ (USA)
Reagenzgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Schlinggazetupfer	Fuhrmann GmbH, Much (Deutschland)
Valu-Set Punktionsbesteck	BD Biosciences, Franklin Lake, NJ (USA)
Zellkratzer	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
Zellkulturflaschen (25 T, 75 T)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
Zellkulturplatten (6-well, 12-well, 24-well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
Zentrifugenröhrchen mit Deckel für Hochgeschwindigkeits-Zentrifuge, 30 ml	Beckman Coulter, Inc., Palo Alto, CA (USA)

2.1.2 Technische Geräte

Tabelle 3: Technische Geräte und Hersteller.

Technisches Gerät	Hersteller
Aesculap® Isis	B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen (Deutschland)
Allegra 64R Zentrifuge	Beckman Coulter, Inc., Palo Alto, CA (USA)
Axio Scope. A1	Zeiss, Jena (Deutschland)
BD FACSCanto II Flow Cytometer	BD Biosciences, Franklin Lake, NJ (USA)
Biofuge primo	Heraeus Sepatech, Osterode (Deutschland)
Biofuge primo R	Heraeus Sepatech, Osterode (Deutschland)
FasPrep-24 (Homogenisator)	MP Biomedicals, Solon, OH (USA)
Galaxy® 170 S	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Gewebeeinbettssystem, Lineares Gewebe- einbettssystem TPC 15 Duo/Trio	Medite GmbH, Burgdorf (Deutschland)
Infrarotlampe	GE, Budapest (Ungarn)
Inverses Phasenkontrast Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon GmbH, Düsseldorf (Deutschland)

MACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Mikrotom, Microm HM430	Microm International GmbH, Walldorf (Deutschland)
MiniVent TYPE 845 Beatmungsgerät Maus	HSE Hugo Sachs Elektronik – HARVARD APPARATUS, March (Deutschland)
Multifuge 3L-R	Heraeus Sepatech, Osterode (Deutschland)
Multipipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Nano Drop 1000/2000 Spektrophotometer	NanoDrop, Wilmington, DE (USA)
Novaflex (OP-Lampe)	World Precision Instruments, Sarasota, FL (USA)
NucleoCounter NC-100 – Mammalian Cell Counter	Chemometec, Allerød (Dänemark)
QiaCube	Qiagen, Hilden (Deutschland)
Rotina 420R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen (Deutschland)
Stemi DV4 SPOT Stereomikroskop	Zeiss, Jena (Deutschland)
StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA (USA)
TProfessional Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen (Deutschland)
Trajan 808, Inhalationsnarkose-Apparat	Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck (Deutschland)
Vevo® 2100 System	FujiFilm VisualSonics Inc., Toronto, Ontario (Kanada)
Wärmekissen	Beurer GmbH, Ulm (Deutschland)

2.1.3 Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits und Hersteller.

Kit	Hersteller
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden (Deutschland)
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA (USA)

2.1.4 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 5: Reagenzien/Chemikalien und Hersteller.

Reagenz/Chemikalie	Hersteller
10 mM dNTP Mix	Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
5x Reverse transcriptase buffer	Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)
Aqua ad iniectabilia Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
Biocoll Separating Solution; Isotonic Solution; Density 1,077 g/ml	Biochrom GmbH, Berlin (Deutschland)
Bovine Serum Albumine (BSA) Fraction V	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Chloroform	J. T. Baker, Phillipsburg, NJ (USA)
Destilliertes Wasser RNA/DNA frei	Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose, GlutaMAX Supplement, pyruvate	Gibco, Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)
Ethanol 50%, 70%, 95%	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)
Ethanol absolute (EtOH abs.)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
FACS lysing solution	BD Biosciences, Franklin Lake, NJ (USA)
Fast SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA (USA)
Fetal calf serum (FCS)	Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)
Fixation Buffer (4% w/v paraformaldehyde)	BD Cytotfix™, Franklin Lake, NJ (USA)
Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent	Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)
Lipopolysaccharid von E. coli 0111:B4 (LPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
MuLV-Reverse-Transcriptase (200 U/μl)	Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)
Oligo(dT) Primer	Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)
Opti-MEM®	Gibco, Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)
Paraplast®	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar (Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim (Deutschland)
Pertex®	Medite GmbH, Burgdorf (Deutschland)

Phosphate-buffered saline (PBS)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)
Picric Acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
QIAzol	Qiagen GmbH, Hilden (Deutschland)
Random Hexamer Primers	Invitrogen, San Diego, CA (USA)
RiboLock RNase Inhibitors	Invitrogen, San Diego, CA (USA)
RPMI Medium 1640 (1x)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)
Siriusrot F3BA	Waldeck GmbH, Münster (Deutschland)
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems, Foster City, CA (USA)
Trypsin-EDTA (10x)	Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)
Xylol	AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland)

2.1.5 Zytokine

Tabelle 6: Zytokine und Hersteller.

Name	Gruppe	Produkt	Hersteller
Granulozyten- /Makrophagenkolonie- stimulierender Faktor (GM-CSF)	Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF)	Recombinant Human GM-CSF	PeproTech, Rocky Hill, NJ (USA)
IFN-γ	Interferone (IFN)	Recombinant Murine IFN- γ	PeproTech, Rocky Hill, NJ (USA)
IL-4	Interleukine (IL)	Recombinant Murine IL-4	PeproTech, Rocky Hill, NJ (USA)
Makrophagenkolonie- stimulierender Faktor (M-CSF)	Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF)	Recombinant Human M-CSF	PeproTech, Rocky Hill, NJ (USA)

2.1.6 Primer

2.1.6.1 Primer für SYBR green qRT-PCR

Tabelle 7: Primer für SYBR green qRT-PCR.

Alle Primer hergestellt von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA).

Gen	Spezies		Sequenz (5'-3')
Arg1	Mus musculus	Vorwärts	GCTTCGGAACCTCAACGGGAGGG
		Rückwärts	ACCAGAAAGGAACTGCTGGGATACA
Fizz1	Mus musculus	Vorwärts	TATGAACAGATGGGCCTCCT
		Rückwärts	GGCAGTTGCAAGTATCTCCAC
IL-10	Mus musculus	Vorwärts	AGCCGGGAAGACAATAACTG
		Rückwärts	CATTTCCGATAAGGCTTGG
IL-1β	Mus musculus	Vorwärts	GGACCCCAAAAGATGAAGGGCTGC
		Rückwärts	GCTCTTGTTGATGTGCTGCTGCG
IL-6	Mus musculus	Vorwärts	ACACATGTTCTCTGGGAAATC
		Rückwärts	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
iNOS	Mus musculus	Vorwärts	CCACCTTGGTGAAGGGACTGAGCT
		Rückwärts	AGGGGCAAGCCATGTCTGAGACT
KLF2	Homo sapiens	Vorwärts	CAAGACCTACACCAAGAGTTCG
		Rückwärts	CATGTGCCGTTTCATGTGC
RPLP0	Homo sapiens	Vorwärts	TCGACAATGGCAGCATCTAC
		Rückwärts	ATCCGTCTCCACAGACAAGG
RPLP0	Mus musculus	Vorwärts	GCGTCCTGGCATTGTCTGT
		Rückwärts	GAAGGCCTTGACCTTTTCAGTAAG
TNF-α	Mus musculus	Vorwärts	GACCCTCACACTCAGATCATCTTCT
		Rückwärts	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT

2.1.6.2 Taqman assays

Tabelle 8: Taqman assays.

Alle Primer hergestellt von Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA.

Taqman assay Name	Spezies	Zielsequenz (5'-3')
Cel-miR-39	C. elegans	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
Hsa-miR-92a	Homo sapiens	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
	Mus musculus	

U6 snRNA	Homo sapiens Mus musculus	GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUUAUACUAAAAUUG GAACGAUACAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGC GCAAGGAUGACACGCAAAUUCGUGAAGCGUUC AUAUUUUUACUGCCCUCCAUGCCCUGCCCCACA AACGCUCUGAUAAACAGUCUGUCCCUGUCUCUCU CCUGCUGCUCCUAUGGAAGCGAAGUUUCCGCU CCUGCAGAAAGCAAAGUUACGACUCAGAGACGG CUGAGGAUGACAUCAGCGAUGUGC
-----------------	------------------------------	---

2.1.7 Antikörper FACS

Tabelle 9: FACS Antikörper und ihre Hersteller.

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Funktion/Zellart	Hersteller
anti-mouse CD206 (MMR)	Allophycocyanin (APC)	Anti-inflammatorische Makrophagen	BioLegend, San Diego (USA)
Hamster Anti-Mouse CD11c	R-phycoerythrin (PE)	Dendritische Zellen	BD Pharmingen™, Franklin Lake, NJ (USA)
Mouse Lineage Antibody Cocktail, with Isotype Control (lin)	V450	T-und B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, NK Zellen, Erythrozyten, Granulozyten	BD Horizon™, Franklin Lake, NJ (USA)
Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™)	-	Blockiert Nicht-Antigen-spezifische Bindung von Antikörpern an FcγIII und FcγII Rezeptoren	BD Pharmingen™, Franklin Lake, NJ (USA)
Rat anti Mouse F4/80	Pacific Blue	Makrophagen	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim (Deutschland)
Rat Anti-Mouse CD117 (c-Kit)	Allophycocyanin (APC)	Hämatopoetische Vorläuferzellen	BD Pharmingen™, Franklin Lake, NJ (USA)
Rat Anti-Mouse CD11b	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	Makrophagen, Granulozyten, Monozyten	BD Pharmingen™, Franklin Lake, NJ (USA)

Rat Anti-Mouse CD11b	Allophycocyanin (APC)	Makrophagen, Granulozyten, Monozyten	BD Pharmingen™, Franklin Lake, NJ (USA)
Rat Anti-Mouse CD4	R-phycoerythrin (PE)	CD4+ T- Lymphozyten	BD Pharmingen™, Franklin Lake, NJ (USA)
Rat Anti-Mouse CD45R	Pacific Blue™	Plasmazytoide Dendritische Zellen	BD Pharmingen™, Franklin Lake, NJ (USA)
Rat anti-Mouse CD8a	V450	CD8a+ T- Lymphozyten	BD Horizon™, Franklin Lake, NJ (USA)
Rat Anti-Mouse Ly-6A/E (sca-1)	R-phycoerythrin (PE)	Hämatopoetische Stammzellen	BD Pharmingen™, Franklin Lake, NJ (USA)
Rat Anti-Mouse Ly-6C	fluorescein isothiocyanate (FITC)	Monozyten, Makrophagen	BD Pharmingen™, Franklin Lake, NJ (USA)
Rat Anti-Mouse Ly-6G	R-phycoerythrin (PE)	Granulozyten	BD Pharmingen™, Franklin Lake, NJ (USA)

2.1.8 Zellkultur – primäre Zellen, Zelllinien

Tabelle 10: Zellarten und Hersteller.

Zellart	Spezies	Ursprung	Verwendet bis Passage	Hersteller
AoSMC	Homo sapiens	Primäre glatte Muskelzellen aus der Aorta	P8	Lonza, Verviers (Belgien)
HCM-c	Homo sapiens	Primärzellen des adulten Herzventrikels	P9	PromoCell GmbH, Heidelberg (Deutschland)
HUVEC	Homo sapiens	Primäre Endothelzellen der Nabelschnurvene	P8	Lonza, Verviers (Belgien)
mECH5V	Mus musculus	Immortalisierte Herzendothelzelllinie aus C57BL/6J Mäusen	∞	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Elisabetta Dejana und Dr. Costanza Giampietro, Biomolecular Sciences and Biotechnologies, School of Sciences, University of Milan

2.1.9 Zellkultur–Medien

Tabelle 11: Zellkultur-Medien und Hersteller.

Medium	Zellart	Zusammensetzung	Hersteller
DMEM Vollmedium	mECH5V	DMEM inklusive 4,5 g/L D-Glucose Pyruvat Supplementiert mit: FCS Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Darmstadt (Deutschland) Boehringer Ingelheim Roche

EGM Vollmedium	HUVEC	EBM supplementiert mit: 10% FCS rhEGF 10 µg/ml Hydrocortison 1 µg/ml Gentamycinsulfat 50 µg/ml Boviner Hirn-Extrakt	Boehringer Ingelheim, Lonza, Verviers (Deutschland)
RPMI 1640 Vollmedium	Humane & murine Monozyten & Makrophagen	RPMI 1640 inklusive Supplementiert mit: FCS (hitze-inakt.) β-Mercaptoethanol Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Darmstadt (Deutschland) Boehringer Ingelheim Roche

2.1.10 Tiere

2.1.10.1 Futter

Tabelle 12: Futter der Mäuse und Hersteller.

Futter	Hersteller
Futter mit hohem Fettanteil (<i>High-fat diet</i> , HFD), 60% Fett [ssniff® EF acc.D12492 (II) mod.] (Pellets)	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest (Deutschland)
ssniff® R/M-H Alleinfuttermittel für die Haltung von Ratten und Mäusen (Pellets)	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest (Deutschland)

2.1.10.2 Verwendete Mäuse (*Mus musculus*)

Tabelle 13: Verwendete Mäuse.

Name	Alter	Experiment	Firma
ApoE^{-/-}	12 Wochen	Atherosklerose-Modell + Mikrovesikel	Charles River Laboratories, Sulzfeld (Deutschland)
C57BL/6J	12 Wochen	Injektion Mikrovesikel AMI-Modell + Mikrovesikel	Charles River Laboratories, Sulzfeld (Deutschland)

miR-92a-1^{-/-}	12 Wochen	AMI-Modell + Mikrovesikel	genOway, Lyon (Frankreich), mind. 5-fache Rückkreuzung auf C57BL/6J im Institut f. kardiovaskuläre Regeneration, Frankfurt (Deutschland)
--------------------------------	-----------	---------------------------	--

2.1.10.3 Medikamente

Tabelle 14: Medikamente und Hersteller.

Name	Wirksame Wirkstoffe	Klasse	Hersteller
Ampicillin-ratiopharm	Ampicillin	β-Lactam-Antibiotikum	ratiopharm GmbH, Ulm (Deutschland)
Bepanthen® Augen-und Nasensalbe	Dexpanthenol	Augensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen (Deutschland)
Bupivacain 0,25% Jenapharm	Bupivacain HCl, (H ₂ O)	Lokalanästhetikum	mibe GmbH Arzneimittel, Brehna (Deutschland)
FORENE® 100% (v/v)	Isofluran	Inhalations-narkotikum	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Wiesbaden (Deutschland)
Jodtinktur „Hetterich“	Iod, Kaliumiodid	Desinfektionsmittel	Teofarma S.R.I., Valle Salimbene (Italien)
Temgesic®	Buprenorphin	Opioid-Analgetikum	Schering-Plough, Kenilworth, NJ (USA)

2.1.11 Software

Tabelle 15: Verwendete Software und Hersteller.

Software	Version	Firma
Adobe Illustrator	CS 5	Adobe Systems GmbH, München (Deutschland)
GraphPad Prism	5.0	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA (USA)
Microsoft® Office:	Professional Plus 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA (USA)
Excel		
Word		
Power Point		

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Isolation von CD14+ Monozyten aus menschlichem peripheren Blut

Um CD14+ Monozyten aus peripherem Blut zu gewinnen, wurde eine Aufreinigung mit magnetischen Partikeln (human CD14 MicroBeads, MACS Miltenyi Biotec) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Bei dieser Methode binden die Magnetpartikel über bestimmte, an sie gekoppelte, Antikörper an die jeweiligen Oberflächenstrukturen auf den Zielzellen. Durch magnetische Anziehung werden die Zellen aus der Suspension herausgefiltert. Handelt es sich hierbei um die Zielzellen, so spricht man von positiver Selektion.

Zuvor mussten die mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) isoliert werden. Dafür wurde das Blut mit einem PBS-Puffer (PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA, pH7,2) verdünnt, woraufhin der vorgelegte Ficoll (Biocoll, Biochrom GmbH) mit dieser Mischung überschichtet wurde, um danach 20 min bei 800 x g und 4 °C zentrifugiert zu werden. Nach Abnahme der Schicht, die die mononukleären Zellen enthielt, und dreimaligem Waschen mit dem PBS-Puffer (Zentrifugation: 10 min, 800 x g, 4 °C, mit Bremse) folgte eine 15-minütige Inkubation mit den CD14+ magnetischen Partikeln bei 4 °C. Nach weiteren Waschschritten konnten die an die Partikel gebundenen CD14+ Monozyten in einem Magnetfeld zurückgehalten und anschließend aufgefangen werden.

2.2.1.2 Differenzierung von CD14+ Monozyten zu Makrophagen

Am Folgetag der Isolation wurden die CD14+ Monozyten mit den Wachstumsfaktoren GM-CSF und M-CSF, wie in Tabelle 16 dargestellt, behandelt. Beide Faktoren sind in der Lage CD14+ Monozyten zu Makrophagen zu differenzieren, allerdings stimuliert GM-CSF bereits die Polarisierung der Zellen in Richtung von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen, wohingegen M-CSF die Zellen zur Polarisierung in Richtung reparativer M2-Makrophagen anregt⁷⁸.

Innerhalb der folgenden 7 Tage wurden beim alle 2 Tage stattfindenden Mediumwechsel auch die Faktoren erneuert. Nach insgesamt 8 Tagen in Kultur wurden dann für 24 h Mikrovesikel (MV) von mock- bzw. KLF2-transduzierten humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (engl. *human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) hinzugegeben, die zuvor mit cel-miR-39 transfiziert worden waren. Die Ernte der Zellen erfolgte 24 h nach Zugabe der Vesikel.

Tabelle 16: Wachstumsfaktoren und verwendete Konzentrationen für die Differenzierung von Makrophagen aus CD14+ Monozyten.

Wachstumsfaktor	Konzentration [µg/ml]
GM-CSF (<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)	0,25
M-CSF (<i>macrophage colony-stimulating factor</i>)	0,05
GM-CSF + M-CSF	0,25 + 0,05

2.2.1.3 Kultivierung der Zellen

Soweit nicht anders beschrieben wurden die HUVECs in endotheliale Basalmedium kultiviert, welches mit Hydrokortison, humanem epidermalem Wachstumsfaktor (engl. *human Epidermal Growth Factor*, hEGF), bovinem Gehirn Extrakt (*bovine brain extract*), Gentamycin/Amphotericin-B (GA) (alle von Lonza, Belgien) und fetalem bovinen Serum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) ergänzt wurde.

Murine mikrovaskuläre Herz-Endothelzellen der Zelllinie H5V (mECH5V) wurden (soweit nicht anders beschrieben) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Invitrogen, Darmstadt) kultiviert, das durch 10% FCS und Penicillin/Streptomycin (Roche, USA) ergänzt wurde. Die humanen Kardiomyozyten (engl. *human cardiomyocytes*, HCMs, PromoCell, Deutschland) wurden im zugehörigen Myozyten-Wachstumsmedium (*Myocyte Growth Medium*, MGM, PromoCell, Deutschland) kultiviert, welches lediglich mit Penicillin/Streptomycin (Roche) supplementiert wurde. Die humanen, glatten Muskelzellen aus der Aorta (engl. *Aortic smooth muscle cells*, AoSMCs, Lonza, Belgien) wurden in dem entsprechenden

Wachstumsmedium (*Smooth Muscle Growth Medium-2*, Lonza, Belgien) kultiviert, dem hEGF, Insulin, humaner Fibroblasten Wachstumsfaktor B (engl. *human Fibroblast Growth Factor-B*, hFGF-B), FBS und GA-1000 hinzugefügt wurde. Humane und murine Monozyten und Makrophagen sind in RPMI 1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute*) kultiviert worden, das mit 10% hitze-inaktiviertem (1 h, 56 °C) FBS, β -Mercaptoethanol, sowie Penicillin/Streptomycin (Roche) angereichert wurde. Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und das Medium wurde (wenn nicht anders beschrieben) alle zwei Tage gewechselt.

2.2.1.4 Passage und Ausbringung der Zellen

Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80 bis 90% erreicht hatten, wurden sie in einem den Zellen entsprechenden Verhältnis passagiert.

Zum Passagieren der adhärennten HUVECs und mECH5Vs wurde der Überstand abgesaugt und nach einmaligem Waschen mit sterilem PBS eine ausreichende Menge (1 ml pro 75T-Flasche) an 0,025%-igem Trypsin-EDTA hinzugegeben, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Nach 3-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von entsprechendem FBS-haltigen Zellkultur-Medium unterbrochen und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt.

Nach Zählung per Zellzähl-Gerät „NucleoCounter NC100“ wurden die Zellen in erwünschter Dichte erneut ausgebracht.

Tabelle 17: Verwendete Zellarten und zugehörige Ausbringungs-Dichten.

Zellart	Ausbringungs-Dichte
AoSMC	6,5 x 10 ⁴ /well einer 12-well-Platte
CD14+ Monozyten	5 x 10 ⁵ /well einer 12-well-Platte
HCM-c	6,5 x 10 ⁴ /well einer 12-well-Platte
HUVEC	1,5 x 10 ⁶ /75T Flasche
	6,5 x 10 ⁴ /well einer 12-well-Platte
mECH5V	2 x 10 ⁶ /75T Flasche
	1,5 x 10 ⁵ /25T Flasche

2.2.1.5 Transduktion der Zellen (HUVEC, mECH5V)

Um eine Überexpression von KLF2 in HUVECs und mECH5Vs zu erreichen, wurde ein retroviraler Vektor verwendet. Für die Herstellung der viralen Partikel wurden zunächst als Verpackungszelllinie die humanen embryonalen Nierenzellen, HEK293T (engl. *human embryonic kidney cells*, HEK) mit drei Plasmiden transfiziert. Diese Plasmide beinhalteten die für die Herstellung des Vektors benötigten Gene und regulatorischen Sequenzen. Das endgültige virale Partikel wurde aus dem Vektorplasmid cPPT-PGK-MCS-PRE-SIN inklusive dem gesamten offenen Leseraster (engl. *open reading frame*, ORF) von humanem KLF2, dem Verpackungsplasmid pCMVΔ8.91 sowie dem Plasmid mit dem Hüllproteingen *env* zusammengesetzt und in der Verpackungszelllinie repliziert, um anschließend ins Medium abgegeben und von dort aus aufkonzentriert zu werden. Dies wurde von meinen Kollegen Dr. Reinier Boon und Dr. Nicolas Jaé, sowie Anurhada Doddaballapur durchgeführt.

Als lentiviraler Kontrollvektor (mock) wurde im gleichen Verfahren derselbe Vektor verwendet, allerdings ohne die KLF2-cDNA. Das Vektorplasmid cPPT-PGK-MCS-PRE-SIN wurde freundlicherweise von Prof. Anton Horrevoets bereitgestellt (Amsterdam, Niederlande).

Die zu transduzierenden HUVECs bzw. mECH5Vs wurden am Tag vor der Transduktion in 25T-Flaschen ausgebracht, sodass die Konfluenz zum Zeitpunkt der Transduktion 60 bis 70% betrug. Die Zellen wurden über 3 Tage mit den aufgereinigten viralen Partikeln transduziert, bevor sie nach mehrmaligem Waschen mit sterilem PBS und dem entsprechenden Zellkulturmedium normal weiterkultiviert wurden. Ab dem fünften Tag nach Transduktion wurde die Überexpression von KLF2 mittels qRT-PCR nachgewiesen.

2.2.1.6 Transfektion der Zellen (HUVEC, mECH5V) mit rekombinanter cel-miR-39 bzw. pre-miR-92a

Um in den HUVECs und mECH5Vs eine Überexpression der exogenen miR cel-miR-39 oder der endogenen miR-92a zu erhalten, wurden die Zellen bei 60 bis 80% Konfluenz per Lipofektion mit der einzelsträngigen, rekombinanten cel-miR-39

oder der Prekursor-miR-92a bei einer Endkonzentration von 100 nM transfiziert (Tabelle 18). Um eine effektive Aufnahme der Lipidvesikel zu gewährleisten, befanden sich die Zellen während der Transfektion in einem serumfreien Medium (Opti-MEM). Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Kurz gesagt wurde für die Transfektion einer 75T-Flasche mit ~70% konfluenten Zellen 8 µl der 100 µM cel-miR-39 bzw. 40 µl der 20 µM pre-miR-92a in 500 µl serumfreiem Opti-MEM gelöst und zeitgleich 25 µl Lipofectamine RNAiMax mit ebenfalls 500 µl Opti-MEM vermischt. Nach Zusammenführung dieser beiden Ansätze folgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, damit die cel-miR-39/pre-miR-92a in die Lipidvesikel verpackt werden konnte. In dieser Zeit wurden die Zellen zwei Mal mit Opti-MEM gewaschen, danach wurde 1 ml der Transfektionsmischung tropfenweise zu 7 ml Opti-MEM pro 75T-Flasche gegeben und das Ganze anschließend 4 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Abschließend erfolgte ein Mediumwechsel mit normalem Vollmedium.

Tabelle 18: Rekombinante miR bzw. Prekursor-miR.

RNA Molekül	Mature microRNA Sequenz (5'-3')	Endkonzentration	Hersteller
Cel-miR-39	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUU G	100 nM	Sigma- Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Cel-miR-39 mit Cy3	gelabelt [Cy3]UCACCGGGUGUAAAUCAG CUUG	100 nM	Sigma- Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Pre-microRNA: Negative Control #1 (Cat# AM17110)	Sequenz unbekannt	100 nM	Ambion, Austin, TX (USA)
Pre-microRNA: hsa-miR-92a-3p (Cat# AM17100)	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	100 nM	Ambion, Austin, TX (USA)

2.2.2 Extrazelluläre Vesikel

2.2.2.1 Generierung von extrazellulären Vesikeln (EV) durch HUVECs und mECH5Vs

Für die Generierung der EV durch HUVECs und mECH5Vs wurden diese Zellen in 75T-Flaschen ausgebracht, am Folgetag wie in 2.2.1.6 beschrieben transfiziert und anschließend 72 h mit 10 ml Vollmedium bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.2.2 Isolation von Mikrovesikeln aus Überständen von HUVECs und mECH5Vs

Nach 72 h wurde der Überstand in sterile 50 ml Falcons überführt und 10 min bei 4 °C und 4000 x g zentrifugiert, um den Zelldebris zu entfernen. Anschließend wurden 8 ml des Überstandes in sterile Ultrazentrifugenröhrchen übertragen und 45 min bei 20.500 x g und 4 °C zentrifugiert, um eine Pelletierung der MV zu erreichen. Nach einem Waschschrift mit eisgekühltem PBS wurde das Ganze für 60 min bei 20.500 x g

und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Poolen der aufgereinigten MV wurden diese entweder in einer ausreichenden Menge Vollmedium der Empfängerzellen oder für die intravenöse (i.v.) Injektion in einer adäquaten Menge sterilem PBS aufgenommen.

2.2.2.3 Transfer von Mikrovesikeln zu Empfängerzellen

Die unterschiedlichen Empfängerzellen wurden in einer entsprechenden Dichte ausgebracht und am Folgetag mit den wie in 2.2.2.2 isolierten Mikrovesikeln inkubiert. Dabei wurde mengenmäßig 1/6 der aus dem Überstand einer 75T-Flasche isolierten MV in ein Well einer 12-well-Platte transferiert, in dem sich die Empfängerzellen in 1 ml Medium befanden.

2.2.2.4 Aufarbeitung der isolierten Mikrovesikel für die Injektion in die Maus

Die Dosis an MV, die pro Maus und Injektion verabreicht wurde, entsprach der Menge an Vesikeln, die aus einer 75T-Flasche nach 72 h isoliert werden konnte. Für die Injektion wurde diese Menge Mikrovesikel in 200 µl sterilem PBS aufgenommen und anschließend in die Schwanzvene injiziert (siehe 2.2.5.2).

2.2.2.5 Aufarbeitung der isolierten Mikrovesikel für RNA-Analyse

Bei jeder MV-Isolation wurde die Menge an Mikrovesikeln, die aus einer 75T-Flasche isoliert wurden, in 200 µl PBS aufgenommen, direkt mit Qiazol vermischt und für die spätere RNA-Isolation bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Durchflusszytometrie der Zellen

Die Durchflusszytometrie kann verwendet werden, um Struktur (v.a. Granularität), Volumen, Größe und Menge der untersuchten Zellen über Analyse ihrer Oberflächenbeschaffenheit und Oberflächenmarker zu bestimmen.

Dazu werden die Zellen mit entsprechenden Antikörpern markiert, die an fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind. Die Zellen passieren einzeln einen Laserstrahl, wobei

zum einen die Brechung des Lichts durch die Zelle und zum anderen ein von der Zelle ausgehendes Fluoreszenzsignal gemessen wird. Mit dieser Methode kann ermittelt werden, welche unterschiedlichen Zelltypen sich in der untersuchten Zellsuspension befinden.

In diesem Fall wurden die mononukleären Zellen aus der Milz der Maus (Splenozyten), wie in 2.2.5.6 beschrieben isoliert und nach Angaben der Hersteller mit verschiedenen Antikörpern gefärbt, um hämatopoetische Stammzellen, T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen voneinander unterscheiden und ihren Anteil an der Gesamtpopulation bestimmen zu können.

Da in den 5 Ansätzen verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig verwendet wurden, musste zuvor eine Kompensation durchgeführt werden um zu ermitteln, wie stark die Streuung eines Farbstoffes in einen anderen Kanal war und damit den störenden Hintergrund ebenfalls zu reduzieren. Dieses Setup wurde dann je Kanal in der späteren Messung verwendet.

Tabelle 19: FACS-Antikörper mit jeweiligem Fluoreszenzfarbstoff und dadurch gefärbte Zellarten.

Ansatz/Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Gefärbte Zellart
A		Lin neg, sca-1 pos, c-Kit pos
sca-1	PE	→ Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs)
lineage AK Cocktail	V450	
c-Kit	APC	
B		CD4 pos, CD8a neg
CD4	PE	→ CD4+ T-Lymphozyten
CD8a	V450	CD4neg, CD8a pos → CD8a+ T-Lymphozyten
C		CD11b pos. Ly-6C pos, F4/80 neg
CD11b	APC	→ Monozyten
Ly-6G	PE	
Ly-6C	FITC	Ly-6C low/med
F4/80	Pacific Blue	→ anti-inflammatorische Monozyten Ly-6C high → pro-inflammatorische Monozyten
D		CD11b pos, F4/80 pos
CD11b	FITC	→ Makrophagen
F4/80	Pacific Blue	
CD206	APC	CD206 pos → pro-inflammatorische Makrophagen CD206 neg → anti-inflammatorische Makrophagen
E		CD11c pos
CD11c	PE	→ Dendritische Zellen
B220	Pacific Blue	B220 pos → plasmazytoide dendritische Zellen B220 neg → klassische dendritische Zellen
Kontroll-Panel (ungefärbt)	-	-

2.2.4 Molekulare Biologie

2.2.4.1 RNA-Isolation mit QIAzol® und miRNeasy Mini Kit

Für die RNA-Isolation wurde nach Anweisung des Herstellers das miRNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet, das auch die Isolation der kurzen RNAs ermöglicht.

Hierfür wurden die Zellen, MV oder das Gewebe in 700 µl QIAzol® (enthält Phenol) aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Nach Hinzugabe von 140 µl Chloroform wurde das Ganze für 15 sec stark geschüttelt. Nach weiteren 2 bis 3 min Inkubation bei RT folgten 15 min Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C. Die wässrige Phase, in der sich nun die RNA befand, wurde abgenommen und mit der 1,5-fachen Menge 99,9%-igem Ethanol vermischt. 700 µl davon wurden dann auf die dem Kit beiliegende Säule gegeben und kurz bei >8000 x g zentrifugiert. Die Säule, auf welcher sich nun die RNA befand, wurde im Folgenden mit den im Kit enthaltenen Wasch-Puffern (1 x 700 µl RWT, 2 x 500 µl RPE) gewaschen und zwischendurch jeweils kurz bei >8000 x g zentrifugiert. Um Überreste von Wasch-Puffern und Ethanol zu entfernen, folgte ein 1-minütiger Zentrifugationsschritt bei einer maximalen Geschwindigkeit von 21.000 x g. Der finale Schritt bestand darin, die RNA von der Säule zu eluieren. Dafür wurde 30 bis 50 µl Wasser auf die Säule pipettiert und 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert.

2.2.4.2 RNA-Isolation mit QIAzol®, miRNeasy Mini Kit und dem QIAcube

Bis zum Abnehmen der wässrigen Phase gleicht die Aufarbeitung der Proben denen in Schritt 2.2.4.1. Bei Verwendung des QIAcube von Qiagen wurden die wässrigen Phasen von bis zu 12 Proben, sowie alle weiteren erforderlichen Substanzen in das Gerät gegeben (Wasch-Puffer, Ethanol, Wasser), in dem inklusive der RNA-Eluierung alle Schritte automatisch durchgeführt wurden.

2.2.4.3 RNA-Konzentrationsbestimmung

Mit 1,5 µl der zuvor wie in 2.2.4.1 isolierten RNA wurde deren Konzentration am NanoDrop 2000 Spektrophotometer ermittelt. Da die RNA in Wasser gelöst vorlag, erfolgte der Nullabgleich des Gerätes mit Wasser.

2.2.4.4 Reverse Transkription von mRNA

Um die Expression von bestimmten Genen bestimmen zu können, muss die mRNA zunächst durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurden standardmäßig die folgenden Substanzen (Tabelle 20) und das folgende Protokoll verwendet (Tabelle 21):

Tabelle 20: Reagenzien und deren Volumina für die reverse Transkription von mRNA.

Reagenz	Volumen [µl]
Nuklease-freies Wasser	0,5
PCR Puffer II	2
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP Mix (10 mM)	1
Random Hexamer Primer (50 µM)	1
MuLV Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,5
RNA (50 ng/µl)	10
Gesamtvolumen/well	20

Tabelle 21: Protokoll der reversen Transkription.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1	20	10
2	43	75
3	99	5
4	4	Pause

2.2.4.5 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) von mRNA

Durch die quantitative real-time PCR kann die zuvor generierte cDNA (siehe 2.2.4.4) gleichzeitig vervielfältigt und quantifiziert werden.

Die Amplifikation bestimmter Abschnitte auf der cDNA erfolgt mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden. Detektiert werden kann die in mehreren Zyklen entstehende DNA durch einen sich in dsDNA einlagernden Farbstoff (SYBR® Green, BioRad), der zwischen den einzelnen Zyklen in Echtzeit gemessen wird.

Die Reaktionssubstanzen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten pipettiert und die Messungen wurden stets in Duplikaten durchgeführt. Als endogene Kontrolle wurde das Haushaltsgen RPLP0 verwendet.

Die relativen Genexpressionslevel wurden anhand folgender Formel errechnet:

$$2^{-\Delta C_T} \text{ mit } \Delta C_T = C_T^{\text{Zielgen}} - C_T^{\text{endogene Kontrolle}}$$

Formel 3: Berechnung des relativen Genexpressionslevels.

Die folgenden Substanzen, sowie das folgende Protokoll wurden verwendet:

Tabelle 22: Reagenzien und ihre Volumina für die qRT-PCR.

Reagenz	Volumen [µl]
Fast SYBR Green Master Mix	10
Vorwärts-Primer (10 µM)	1
Rückwärts-Primer (10 µM)	1
cDNA (1:5 verdünnt)	8
Gesamtvolumen/well	20

Tabelle 23: Protokoll für StepOnePlus Real-Time-PCR System.

Phase	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min:sec]
Holding stage	1	95	00:20
Cycling stage	1	95	00:03
(40-fache Wiederholung)	2	60	00:30
Melt curve stage	1	95	00:15
	2	60	1:00
	3	95	00:15

2.2.4.6 Reverse Transkription von miRNA

Um die Expression bestimmter miRs bestimmen zu können, muss auch die miRNA zunächst durch reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurde das TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit in Verbindung mit den microRNA-spezifischen stem-loop RT Primern verwendet. Insgesamt wurden bei diesem Vorgang 8 ng/µl RNA eingesetzt, aus der durch die microRNA-spezifischen Primer in einem Thermozykler (Tprofessional, Biometra GmbH) die entsprechende spezifische cDNA hergestellt wurde. Sollte der microRNA-Gehalt in den MV oder in der Intima ermittelt werden, so wurden 2 µl von deren RNA pur in die RT Reaktion eingesetzt.

Hierfür wurden die folgenden Substanzen und das folgende Protokoll verwendet:

Tabelle 24: Reagenzien und deren Volumina für die reverse Transkription von miRNAs.

Reagenz	Volumen [µl]
RT Puffer (10X)	1,50
dNTP Mix (mit dTTP) (100 mM)	0,15
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,19
MultiScribe™ RT Enzym (50 U/µl)	1,00
miR-spezifische RT-Primer (5X)	3,00
Nuklease-freies Wasser	7,16
+ RNA (4 ng/µl)	2
Gesamtvolumen	15

Tabelle 25: Protokoll der reversen Transkription von miRNAs.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min:sec]
1	16	30:00
2	42	30:00
3	85	00:30
4	4	∞

2.2.4.7 qRT-PCR von miRNAs

Durch die quantitative real-time PCR kann die zuvor miR-spezifisch generierte cDNA (siehe 2.2.4.6) gleichzeitig vervielfältigt und quantifiziert werden. Die mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden in mehreren Zyklen amplifizierte cDNA kann durch einen bei der Polymerisation freigesetzten Reporterfarbstoff detektiert werden, der zwischen den einzelnen Zyklen in Echtzeit gemessen werden kann. Die Reaktionssubstanzen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten pipettiert und die Messungen wurden stets in Duplikaten durchgeführt. Als interne Kontrolle wurde das Haushaltsgen U6 snRNA (engl. *small nuclear ribonucleic acid*, kurze nukleäre RNA) verwendet. Lediglich beim Messen der miR-Gehalte in MV wurde auf eine interne Kontrolle verzichtet, da bisher keine verlässlichen Haushaltsgene bekannt sind, die immer im selben Maße in die MV exportiert werden.

Die relativen miR-Level wurden anhand folgender Formel errechnet:

$$2^{-\Delta C_T} \text{ mit } \Delta C_T = C_T^{\text{miR}} - C_T^{\text{endogene Kontrolle}}$$

Formel 4: Berechnung des relativen microRNA-Levels.

Aus oben genannten Gründen wurden alle Ergebnisse von miR-Gehalten in MV lediglich als 2^{-C_T} angegeben, da keine Normalisierung auf ein Haushaltsgen möglich war. Zusätzlich zu dem relativen Level an cel-miR-39 ($2^{-\Delta C_T}$), wurde zum Teil die Anzahl an cel-miR-39-Kopien in den Empfängerzellen bestimmt. Dafür wurde die rekombinante cel-miR-39 in einer bestimmten Konzentration (0,025 picomol in 15 µl Reaktionsvolumen) in die RT-PCR eingesetzt und stellte damit die Grundlage für eine Standardkurve dar, zu welcher alle gemessenen CT-Werte anschließend ins Verhältnis gesetzt und dadurch in eine absolute Zahl an Kopien umgerechnet werden konnten.

Die folgenden Substanzen, sowie das folgende Protokoll wurden verwendet:

Tabelle 26: Reagenzien und ihre Volumina für die qRT PCR von miRNAs.

Reagenz	Volumen [μ l]
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2X)	10
Echtzeit Primer (20X)	1
Nuklease-freies Wasser	6
RT-Produkt	3
Gesamtvolumen	20

Tabelle 27: Protokoll für die qRT PCR von miRNAs.

Phase	Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer [min:sec]
Holding stage	1	95	00:20
Cycling stage	1	95	00:01
(40-fache Wiederholung)	2	60	00:20

2.2.5 Tierversuche

Die Durchführung aller Tierversuche erfolgte im Sinne des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) und den Europäischen Gesetzen. Alle Tierversuche wurden zuvor vom Regierungspräsidium Darmstadt (Hessen) genehmigt.

2.2.5.1 Haltebedingungen der Tiere

Alle Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 23 ± 1 $^{\circ}$ C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten. Ihr Zugang zu Futter und Wasser erfolgte stets *ad libitum*. Bei dem Futter handelte es sich um ein Basis-Futter, welches in Pellet-Form vorlag (ssniff® R/M H Alleinfuttermittel für die Haltung von Ratten und Mäusen). Die ApoE^{-/-} Tiere erhielten stattdessen 2 Wochen lang eine Diät mit 60% Fettanteil (ssniff® EF acc.D12492 (II) mod.), die ebenfalls als Pellets vorlag.

2.2.5.2 Intravenöse Injektion der Mikrovesikel in die Schwanzvene (*Vena caudalis*)

Nach Isolation und Aufarbeitung der MV aus Maus-Endothelzellen (siehe 2.2.2.2), lagen diese gelöst in 200 µl PBS vor und wurden den Mäusen jeweils 24 h vor Tötung und Organentnahme i.v. in die dorsale oder eine der beiden lateralen Schwanzvenen verabreicht. Dafür wurde die Maus kurzzeitig per Inhalation anästhesiert und die Schwanzvene zuvor kurz mit einer Rotlichtlampe bestrahlt, um eine Vasodilatation der *Vena caudalis* hervorzurufen.

2.2.5.3 Modell des akuten Myokardinfarkts

Bei dieser im Schnitt 30-minütigen Methode wird durch dauerhaften Verschluss des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA, engl. *left anterior descending*, LAD) der *Arteria coronaria sinistra* (engl. *left coronary artery*, LCA) ein akuter Myokardinfarkt (engl. *acute myocardial infarction*, AMI) mit Ischämie in den distal des Verschlusses gelegenen Gebieten hervorgerufen.

Um dies zu erreichen, wurde die Maus zunächst kurz in einer Ganzkörperkammer (Einleitung der Anästhesie) und dann über eine Maske mit Isofluran anästhesiert. Für die Dauer des gesamten Eingriffes wurde die Maus auf einer Wärmematte platziert, um die Körpertemperatur aufrechtzuerhalten. Es folgte eine prophylaktische Buprenorphingabe (0,1 mg/kg KGW), wobei es sich um ein stark wirksames Analgetikum aus der Gruppe der Opioide handelt. Nach Applikation der Augensalbe, um ein Austrocknen der Augen zu vermeiden, und Haarentfernung an der linken Brustwand sowie dem medialen Halsbereich, wurde die Haut mittels Povidon-Iod desinfiziert.

Gleichzeitig erfolgte durch subkutane (s.c.) Injektion des Lokalanästhetikums Bupivacain (0,25%, 1-2 mg/kg) eine Interkostalnervenblockade an der linken Brustwand. Für die Dauer des Eingriffes erfolgte eine endotracheale Intubation. Nach Setzen eines medialen Hautschnittes im oberen Halsbereich wurde die über der Trachea liegende Muskulatur nach lateral retraktiert. So konnte unter Sichtkontrolle die orale Intubation erfolgen, wobei der Tubus bis in die Trachea vorgeschoben und abschließend mit einem 6-0 Faden am Mundwinkel festgenäht wurde. Der Tubus wurde nun an das Be-

atmungsgerät angeschlossen und die intraoperative Beatmung wurde gestartet (200 Atemzüge/min, 200-300 µl/Atemzug).

Nach Verlagerung der Maus auf die rechte Seite erfolgte die Thorakotomie mit einem 2 cm langen Hautschnitt über dem 5. linken Interkostalraum. Der Thorax wurde zwischen 5. und 6. Rippe auf einer Länge von etwa 1 cm vorsichtig eröffnet. Dabei musste insbesondere darauf geachtet werden, dass der lateral darunterliegende linke Lungenflügel sowie die medial gelegene *Arteria thoracica interna* nicht verletzt wurden.

Durch Einsetzen von Retraktoren wurde das Herz sichtbar gemacht. Ab diesem Zeitpunkt wurde die weitere Operation mit Hilfe des Operationsmikroskops (Stemi DV4 SPOT, Zeiss) durchgeführt. Zunächst wurde das Perikard (*Pericardium fibrosum* und *Lamina parietalis* des *Pericardium serosum*) vorsichtig mit einer anatomischen Pinzette eröffnet und der absteigende Ast der linken Koronararterie aufgesucht. Dieser *Ramus interventricularis anterior* tritt unter dem linken Herzohr (*Auricula sinistra*) hervor und ist Richtung Herzspitze (*Apex cordis*) gerichtet. Das Gefäß wurde mit einem 8-0 Faden etwa auf mittlerer Höhe und in mittlerer Tiefe ligiert und der Faden gekürzt. Je nach leicht unterschiedlicher Höhe und Tiefe der Ligatur kann dabei die Infarktgröße schwanken. Im Anschluss wurde der Thorax in drei Schichten mit Einzelknopfnähten wieder verschlossen, wobei darauf geachtet wurde, dass durch leichte Kompression des Thorax möglichst wenig Luft darin verblieb, um den offenen, iatrogenen Pneumothorax zu minimieren.

Der Hautschnitt über der Trachea wurde ebenfalls durch eine Einzelknopfnahrt verschlossen und nach anschließender Abschaltung der Inhalationsnarkose wurde die Beatmung zunächst noch aufrechterhalten. Nachdem die Maus spontane Eigenatmung zeigte, wurde der Tubus entfernt und die Maus für die Aufwachphase unter eine Rotlichtlampe gelegt. Um die postoperative Analgesie sicherzustellen, wurde in den ersten Tagen nach der Operation zweimal täglich bei kurzer Inhalationsnarkose Buprenorphin (0,1 mg/kg KGW) intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Die Infektionsprophylaxe erfolgte über Ampicillin, das bis zum siebten Tag *post operationem* (post op) über das Trinkwasser (650 µl Ampicillin-ratiopharm 2,0 g in 250 ml H₂O) verabreicht wurde.

Das Vorliegen eines Myokardinfarktes und somit die Bestätigung der erfolgreichen Durchführung der OP wurde innerhalb von 24 h post op nicht-invasiv mittels Echo-

kardiographie unter Inhalationsnarkose bestimmt. Nur diejenigen Mäuse, bei denen durch diese Methode der Infarkt nachgewiesen werden konnte, wurden in den Versuch aufgenommen. Sie erhielten 24 h post op einmalig eine Injektion der Mikrovesikel (siehe 2.2.5.2).

24 h nach Injektion wurden die Tiere getötet, entblutet und die Organe wie in 2.2.5.5 beschrieben entnommen und weiterverarbeitet. Um einen guten Allgemein- und Gesundheitszustand der Tiere gewährleisten zu können, wurden sie nach der Operation täglich anhand eines *Animal Health Score Sheets* beurteilt.

2.2.5.4 Atherosklerose-Modell in ApoE^{-/-} Mäusen

Bei diesem genetischen Modell wird bei ApoE^{-/-} Mäusen durch Fütterung einer besonders fetthaltigen Diät Atherosklerose induziert. In diesem Fall wurden die ApoE^{-/-} Mäuse (gekauft bei Charles River) 2 Wochen lang mit einer stark fetthaltigen Diät gefüttert. Während dieser 2 Wochen wurden jeweils 1 Mal pro Woche PBS oder MV von normalen oder KLF2-transduzierten, cel-miR-39-transfizierten Mausendothelzellen in eine Schwanzvene injiziert (siehe 2.2.5.2), wobei die zweite Injektion 24 h vor Tötung und Organentnahme erfolgte.

2.2.5.5 Organentnahme und Aufarbeitung für RNA-Isolation

Bereits bei der Tötung wurde ein Teil des peripheren Blutes als Probe entnommen, mit 800 µl TRIzol vermischt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. Weiterhin wurde je nach Modell das Herz sowie Leber, Niere, Milz, Media & Adventitia der Aorta und aortale Intima für die Isolation von RNA entnommen.

Im Myokardinfarkt-Modell wurde dabei das Herz in gesundes Gewebe (engl. *remote zone*), Grenzgebiet (engl. *border zone*) und infarziertes Gewebe (engl. *infarct zone*) unterteilt und von allen 3 Zonen ein wenn möglich 4 x 4 x 4 mm großes Stück entnommen. Die Unterteilung der 3 Bereiche erfolgte dabei visuell, da sich das infarzierte Gewebe deutlich blasser als umliegendes Gewebe darstellte. Von Leber, Niere und Milz wurde ebenfalls jeweils ein 4 x 4 x 4 mm großes Stück entnommen. All diese

Organstücke wurden in Schraubgefäße mit Keramikugel und 850 µl QIAzol gefüllt, anschließend im FastPrep-24 Homogenisator (MP Biomedicals) für die weitere Bearbeitung ausreichend homogenisiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

Die Aorta wurde aus dem Körper herauspräpariert und anschließend in der Mitte geteilt. Beide Teilstücke wurden anschließend einmalig mit QIAzol durchspült, sodass sich die innerste Schicht der Aorta, die Intima, darin lösen und aufgefangen werden konnte. Mit der restlichen Aorta wurde anschließend so verfahren wie mit den übrigen Organen. Bevor die RNA-Isolation wie in Schritt 2.2.4.1 beschrieben durchgeführt werden konnte, mussten die aufgetauten Organproben zunächst bei 12.000 x g und 4 °C 15 min zentrifugiert werden, um Organreste und Zelldebris zu entfernen. Nach diesem Schritt wurden 700 µl des Überstandes abgenommen und mit ihnen wie in 2.2.4.1 beschrieben fortgefahren.

2.2.5.6 Gewinnung von mononukleären Zellen aus der Milz über Dichtegradienten

Nachdem ausreichend Material für die RNA-Analyse von der Milz abgetrennt wurde, lagerte der Rest kurzfristig in 3 ml RPMI 1640. Die Milz und das Medium wurden dann in steriler Umgebung in eine Zellkulturplatte geschüttet, in der die Milz mit einem 10 ml Spritzenstempel sanft zerdrückt wurde. Mit dem dabei entstehenden Gemisch aus Zellen, Gewebe und Medium wurde dann langsam der vorgelegte Maus-Ficoll überschichtet, wobei die bindegewebige Hülle der Milz nicht übertragen wurde. Nach 40-minütigem Zentrifugieren bei 400 x g und RT ohne Bremse wurde dann der weißliche Ring oberhalb der Ficoll-Schicht, der die mononukleären Zellen enthielt, abgenommen und in mehreren Schritten mit PBS gewaschen (Zentrifugation jeweils 10 min, 800 x g, RT).

2.2.5.7 Gewinnung von Makrophagen aus der Bauchhöhle

Um Makrophagen aus der Bauchhöhle (*Cavitas abdominalis*) der Maus zu isolieren, wurde diese zunächst durch terminale Anästhesie und anschließende zervikale Dislo-

kation getötet. Die Haut wurde vom Becken bis zum Hals geöffnet und zu den Seiten hin abgezogen und auf einer Platte befestigt. Die Bauchmuskulatur wurde mit Hilfe einer dritten Hand nach oben gezogen, woraufhin etwa 1 cm caudal des Xyphoids ein punkartiger Eingang zur Bauchhöhle hergestellt wurde, durch den anschließend eiskaltes PBS mit einer Pasteurpipette eingefüllt wurde. Bei zugehaltener Öffnung wurde die Bauchhöhle nun von außen leicht massiert, um die peritonealen Makrophagen zu lösen. Die anschließend wieder abgenommene Flüssigkeit sollte leicht trüb sein und wurde in einem Gefäß gesammelt. Nach mehrfachen Wiederholungen dieser Prozedur konnten die Makrophagen bei 300 x g abzentrifugiert, in passendem Medium aufgenommen und in angemessener Zelldichte ausgebracht werden. Da die Makrophagen innerhalb von 4 h am Plastik der Zellkulturplatte adhärten, wurde nach diesem Zeitraum nochmals das Medium gewechselt, um eventuelle Verunreinigungen (Erythrozyten, etc.) zu entfernen.

2.2.5.8 Aktivierung der Differenzierung von Peritoneal-Makrophagen zu M1- oder M2-Makrophagen

Die auf eben beschriebene Weise isolierten Makrophagen wurden für 36 h mit von mECs stammenden MV inkubiert. Nach dieser Zeit wurde für weitere 24 h eine Mischung aus Zytokinen und Lipopolysaccharid (LPS) hinzugegeben. Dabei sollten die Makrophagen durch gleichzeitige Zugabe von LPS und Interferon- γ (IFN- γ) in pro-inflammatorische M1-Makrophagen differenzieren, wohingegen die Inkubation mit Interleukin-4 (IL-4) zur Differenzierung in M2-Makrophagen führen sollte.

Tabelle 28: Makrophagen-differenzierende Substanzen.

Erwünschter Zelltyp	Hinzugegebene Substanzen	Konzentration [ng/ml Medium]
M1-Makrophagen	LPS +	100
	IFN- γ	20
M2-Makrophagen	IL-4	200

2.2.6 Histologie

2.2.6.1 Paraffineinbettung und Gewebeschnitte

Die Maus-Herzen und -Milzen wurden nach 24-stündiger Fixierung in 4%-igem Formalin maschinell in Paraffin eingebettet und anschließend mit einem Mikrotom 4 μ m dicke Schnitte hergestellt.

2.2.6.2 Kollagenfärbung mit Picro-Siriusrot

Um eine Kollagenfärbung der Gewebeschnitte der Maus-Herzen durchzuführen wurden diese zunächst durch eine absteigende Alkoholreihe, wie in Tabelle 29 gezeigt, deparaffinisiert. Im Folgenden wurden sie 1 h mit einer 0,1%-igen Picro-Siriusrot-Lösung gefärbt und anschließend mit verdünnter Essigsäure entfärbt. Es folgte eine Dehydrierung der Präparate in 100%-igem Ethanol. Die Schnitte wurden dann mit Pertex® eingedeckt. Die Aufnahmen wurden mit dem Axio Scope. A1 der Firma Zeiss angefertigt.

Tabelle 29: Schritte zum Deparaffinisieren der Gewebeschnitte.

Hinzugegebene Substanzen	Zeit [min]
Xylol	2 x 10
100% EtOH	5
95% EtOH	5
80% EtOH	5
70% EtOH	5
50% EtOH	5
Aqua dest.	5
PBS	5

2.2.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Gewebeschnitte der Maus-Milzen erfolgte im Institut der Pathologie des Universitätsklinikums Frankfurt, Deutschland. Die Aufnahmen wurden mit dem Axio Scope. A1 der Firma Zeiss angefertigt.

2.2.7 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (engl. *standard error of the mean*, SEM) angegeben. Die statistischen Berechnungen wurden allesamt mit GraphPad Prism 5® durchgeführt. Wurden lediglich zwei Gruppen miteinander verglichen, so wurde der Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben angewendet. Handelte es sich um mehrere Gruppen, kam, soweit nicht anders beschrieben, die einfaktorielle Varianzanalyse (engl. *analysis of variance*, ANOVA) mit Korrektur des Signifikanzniveaus nach der Bonferroni-Methode zum Einsatz.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung und Quantifizierung des Transfers von mit micro-RNAs beladenen Mikrovesikeln in unterschiedliche Empfängerzellen

Es ist bekannt, dass von Endothelzellen (ECs) produzierte Mikrovesikel (MV) in der Lage sind, den in ihnen verpackten Inhalt zu diversen Empfängerzellen zu transportieren^{67,75,79}. Dabei ist noch unklar, ob es quantitative Unterschiede in der Aufnahmerate der verschiedenen Empfängerzellen gibt, ob also die interzelluläre Kommunikation zwischen Endothelzellen und Empfängerzellen über Mikrovesikel spezifisch gerichtet ist.

Bei den folgenden zwei *in vitro*-Experimenten handelt es sich um Vorversuche zu späteren *in vivo*-Versuchen im akuten Myokardinfarkt-Modell und im Atherosklerose-Modell.

3.1.1 Mikrovesikel von mock/KLF2-transduzierten HUVECs transferieren cel-miR-39 *in vitro* in unterschiedlichem Maße zu Empfängerzellen des kardiovaskulären Systems

Es soll die Frage beantwortet werden, ob es *in vitro* zellspezifische Unterschiede in Transfer und Aufnahme von mit microRNAs (miRs) beladenen Mikrovesikeln gibt.

Da in Bezug auf extrazelluläre Vesikel bekannt ist, dass der Transkriptionsfaktor *Krüppel-like factor 2* (KLF2) in Endothelzellen deren Komposition modifiziert⁷⁵, erfolgte eine vorherige Transduktion der Mikrovesikel-Spenderzellen mit KLF2, um dessen Rolle in der Beladung, Übertragung und Aufnahme von endothelialen Mikrovesikeln zu untersuchen.

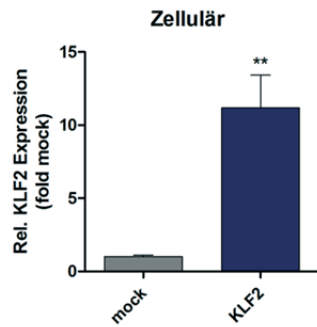
Es besteht ein klarer Zusammenhang zwischen anhaltender laminarer Strömung, der dadurch auf Endothelzellen wirkenden Schubspannung und der KLF2-Expression⁸⁰⁻⁸². KLF2 wird in Endothelzellen, die einer großen Schubspannung ausgesetzt sind, vermehrt exprimiert und wurde als ein Vermittler der atheroprotektiven Wirkung von laminarer Strömung identifiziert⁸³. Gefäßbereiche, die einer geringen laminaren oder sogar turbulenten Strömung ausgesetzt sind (Bifurkationen, Abzweigungen), unterlie-

gen niedriger Schubspannung, exprimieren daher geringe Level an KLF2 und sind gleichzeitig anfällig für die Bildung atherosklerotischer *Plaques*^{84,85}. Um laminare Strömung *in vitro* zu simulieren wurde in den endothelialen Mikrovesikel-Spenderzellen (engl. *human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) KLF2 lentiviral überexprimiert⁸⁰⁻⁸² (Abb.15A). Als Kontrolle dienten die mock-(= pseudo-) transduzierten HUVECs und das Ergebnis wird angegeben im Verhältnis zu mock (engl. *fold mock*).

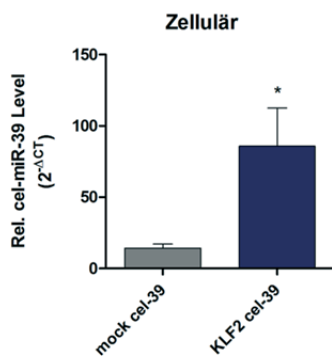
Die Zellen wurden weiterhin erfolgreich mit der für das humane System exogenen cel-miR-39 (miR-39 des Nematoden *C. elegans*) transfiziert und deren Level nach 72 h per real-time PCR bestimmt. Die Darstellung erfolgt zum einen als $2^{-\Delta CT}$, um zu zeigen, dass ein ausreichend hoher Level an cel-miR-39 vorliegt und zum anderen im Verhältnis zu mock (*fold mock*), um den Unterschied zwischen mock- und KLF2-transduzierten Zellen deutlicher herauszustellen. Die KLF2-transduzierten Endothelzellen zeigten im Vergleich zu mock einen signifikant erhöhten cel-miR-39-Level (Abb.15B+C).

Nach Isolation der Mikrovesikel wurde deren cel-miR-39-Gehalt ebenfalls per real-time PCR gemessen (Abb.15D). Die von KLF2-transduzierten Spenderzellen kommenden Mikrovesikel wiesen hierbei einen signifikant höheren cel-miR-39-Level auf, als die mock-Mikrovesikel (Abb.15E). Die cel-miR-39-Level innerhalb der Mikrovesikel werden hier nicht als $2^{-\Delta CT}$ angegeben, da es bisher kein bekanntes *housekeeping* Gen für Mikrovesikel gibt, von dem bekannt wäre, dass es immer im selben Maße exportiert wird. Die Darstellung erfolgt somit als 2^{-CT} und zusätzlich als *fold mock*.

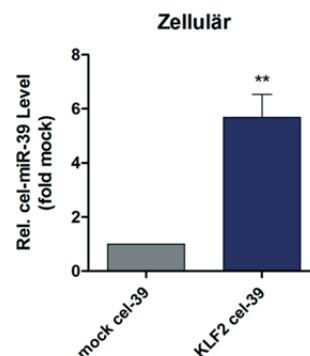
A



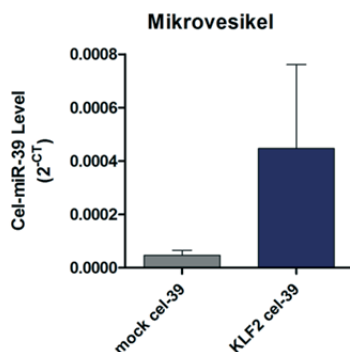
B



C



D



E

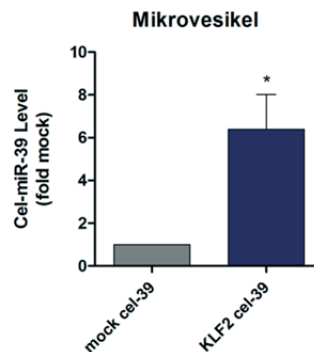


Abb. 15: KLF2-Transduktion der HUVECs, sowie nach zusätzlicher Transfektion mit cel-miR-39 intrazellulär und in den Mikrovesikeln signifikant höhere cel-miR-39-Level als in Kontrollen (mock).

(A) Überexpression von KLF2 in HUVECs, 10 Tage nach lentiviraler Transduktion mit KLF2 und mock; n=6. (B) Relativer cel-miR-39-Level in mock- und KLF2-transduzierten HUVECs, 72 h nach 100 nM Transfektion mit rekombinanter cel-miR-39, (C) zusätzlich dargestellt im Verhältnis zu mock-transduzierten HUVECs; n=6. (D) Cel-miR-39-Level in von mock oder KLF2-transduzierten HUVECs produzierten Mikrovesikeln, (E) zusätzlich dargestellt im Verhältnis zu Mikrovesikeln von mock transduzierten HUVECs; n=6. Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (engl. *standard error of the mean*, SEM) angegeben. *p<0.05, **p<0.01.

Im nächsten Schritt wurden die Empfänger-Zelltypen für 24 h mit den miR-beladenen Mikrovesikeln inkubiert. Bei den gewählten Zellarten handelte es sich um Zellen, die bei einem akuten Myokardinfarkt involviert sind, darunter Endothelzellen, vaskuläre glatte Muskelzellen (SMCs), Kardiomyozyten (HCMs) und Immunzellen. Innerhalb der Immunzellen wurden Monozyten, die über 7 Tage mit verschiedenen Wachstumsfaktoren (GM-CSF, M-CSF) zu Makrophagen (M ϕ) differenziert wurden, einbezogen (0,25 μ g/ml GM-CSF, 0,05 μ g/ml M-CSF). Hierbei muss erwähnt werden, dass der

Faktor GM-CSF (engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) bereits die Polarisierung der Makrophagen in die pro-inflammatorische M1-Richtung anregt, wohingegen Makrophagen nach M-CSF-Behandlung (engl. *macrophage-stimulating factor*) hin zu M2-Makrophagen polarisiert sind⁷⁸. In einer der Konditionen wurden die Monozyten mit beiden Faktoren behandelt, sodass eine gemischte Population entstand (Mø 1+2).

Zunächst konnte festgestellt werden, dass sowohl die mock-, als auch die KLF2-Mikrovesikel cel-miR-39 erfolgreich in alle Empfängerzellen transferierten (Abb.16A+B). Die KLF2-Mikrovesikel lieferten dabei innerhalb jeder Empfängerzellart mehr der miR als mock-Mikrovesikel, was in allen Zellarten in ähnlichem Maße zu beobachten war (Abb.16C+D). Diese höheren Level nach KLF2-Mikrovesikel-Inkubation kamen vor allem dadurch zustande, dass der Gehalt an cel-miR-39 bereits in den Spenderzellen und deren Mikrovesikeln ca. 6-fach erhöht war (Abb.15B-E).

Die höchsten cel-miR-39-Level nach Inkubation mit mock- und KLF2-Mikrovesikeln zeigten innerhalb der Gewebezellen vaskuläre glatte Muskelzellen und Kardiomyozyten und innerhalb der Immunzellen die unbehandelten Monozyten (Abb.16E+F). In der Gruppe der differenzierten Makrophagen lagen in den in Richtung M1 polarisierten Makrophagen die höchsten Level vor, wohingegen M2-polarisierte Makrophagen und die gemischte Population sowohl nach mock-, als auch nach KLF2-Mikrovesikel-Gabe ähnliche cel-miR-39-Level zeigten (Abb.16F).

Es kann somit festgehalten werden, dass quantitative, zelltypspezifische Unterschiede in der Effektivität des Transfers bestehen.

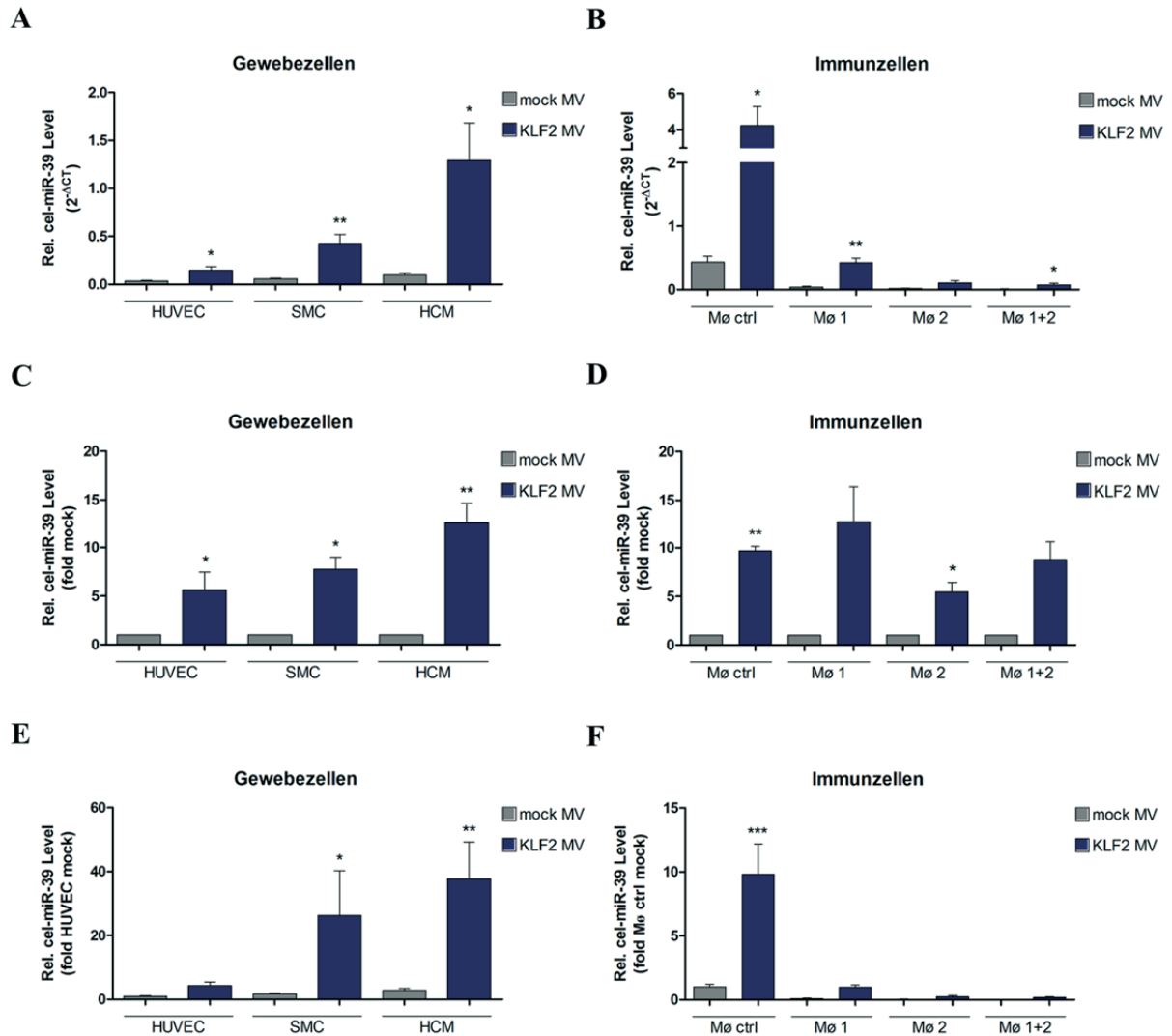


Abb. 16: Cel-miR-39-beladene mock- und KLF2-Mikrovesikel von HUVECs transferieren die miR mit unterschiedlicher Effektivität zu diversen Empfängerzellen.

(A) Relativer cel-miR-39-Level in Gewebe-Empfängerzellarten: Endothelzellen (HUVECs), vaskuläre glatte Muskelzellen (SMCs), Kardiomyozyten (HCMs), nach 24-stündiger Inkubation mit cel-miR-39-beladenen MV von mock- oder KLF2-transduzierten HUVECs; n=3-7. Statistik pro Zellart per Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzen beziehen sich daher auf die, der jeweiligen Zellart zugehörige, Kontroll-Kondition (mock). (B) Relativer cel-miR-39-Level in Immunzellen: 7 Tage unbehandelte Monozyten (Mø ctrl), M1-Makrophagen (Mø 1) nach 7-tägiger Inkubation mit GM-CSF, M2-Makrophagen (Mø 2) nach 7-tägiger Inkubation mit M-CSF und gemischte Makrophagen-Population (Mø 1+2) nach 7-tägiger Inkubation mit GM- und M-CSF; jeweils nach 24-stündiger Inkubation mit cel-miR-39-beladenen MV von mock- oder KLF2-transduzierten HUVECs; n=3-7. Statistik pro Zellart per Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzen beziehen sich daher auf die, der jeweiligen Zellart zugehörige, Kontroll-Kondition (mock). (C+D) Beide Graphen zusätzlich dargestellt im Verhältnis zur jeweiligen, zellartspezifischen mock-Kondition; n=3-7. Statistik pro Zellart per einseitigem t-Test (hypothetischer

Vergleichswert = 1,0). Signifikanzen beziehen sich auf die, der jeweiligen Zellart zugehörige, Kontroll-Kondition (mock). (E+F) Beide Graphen zusätzlich dargestellt im Verhältnis zur mock-Kondition der Empfängerzellart HUVEC bzw. unbehandelter Monozyten; n=3-7. Statistik berechnet per einfaktorieller Varianzanalyse (engl. *analysis of variance*, ANOVA) mit Korrektur des Signifikanzniveaus nach der Bonferroni-Methode. Signifikanzen beziehen sich auf HUVEC mock-MV.

Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Zusätzlich zum relativen Level wurde durch eine Standardkurve die absolute Anzahl an cel-miR-39-Kopien in den Empfängerzellen bestimmt. Mit Hilfe dieser absoluten Zahlen konnte somit zusätzlich der Export der cel-miR-39 aus den Spenderzellen in die Mikros vesikel sowie die Aufnahme in die Empfängerzellen berechnet werden (Formel 5+Formel 6). Im Vergleich zu mock-transduzierten Spenderzellen, zeigte sich kein Unterschied im Export von cel-miR-39 aus KLF2-transduzierten Spenderzellen in die Mikros vesikel (Abb.17).

$$Export = \frac{Kopien\ cel - miR - 39\ MV\ pro\ Flasche}{Kopien\ cel - miR - 39\ Spenderzellen\ pro\ Flasche}$$

Formel 5: Formel zur Berechnung des cel-miR-39-Exports von Spenderzellen in Mikros vesikel.

$$Aufnahme = \frac{Kopien\ cel - miR - 39\ Empfängerzellen\ pro\ Flasche}{Kopien\ cel - miR - 39\ MV\ pro\ Flasche}$$

Formel 6: Formel zur Berechnung der cel-miR-39-Aufnahme von Mikros vesikeln in die Empfängerzellen.

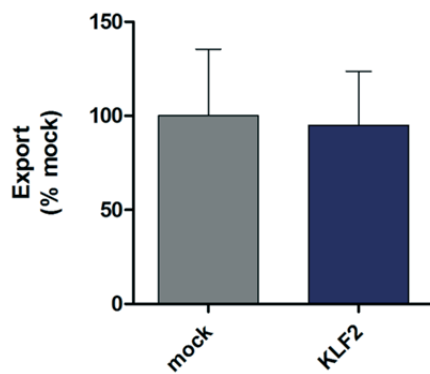


Abb. 17: Die KLF2-Transduktion bewirkt keine Veränderung am Export von cel-miR-39 aus HUVECs in Mikrovesikel.

Export von cel-miR-39 aus mock bzw. KLF2-transduzierten HUVECs in MV als Quotient aus cel-miR-39-Kopien in MV und Spenderzellen (Formel 5), hier dargestellt als Prozentanteil von mock; n=6-7.

Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Die Aufnahme wird angegeben als Prozent der den Empfängerzellen über Mikrovesikel zugeführten miR-Menge (100%) 24 h nach Inkubation (Abb.18A+B). Hierbei wird der bereits zu Anfang bestehende unterschiedliche cel-miR-39-Gehalt in den von mock- oder KLF2-transduzierten Mikrovesikeln (Abb.15E) dadurch herausgerechnet, dass die mit diesen Vesikeln behandelten Zellen ins Verhältnis zum jeweiligen ursprünglichen miR-Gehalt der Mikrovesikel gesetzt wurden. Sollten also nach wie vor Unterschiede zwischen mock- und KLF2-Mikrovesikel-behandelten Zellen auftreten (Abb.18B), so ist dies auf eine verstärkte Transfereffektivität durch KLF2-Vesikel zurückzuführen.

Prinzipiell waren zwischen 0,04 und 2,14% der ursprünglich in Mikrovesikeln hinzugegebenen cel-miR-39 in den unterschiedlichen Empfängerzellen detektierbar (Abb.18A+B). Innerhalb der Gewebezellen zeigten Kardiomyozyten und vaskuläre glatte Muskelzellen die höchste Aufnahmerate, während innerhalb der Immunzellen die über 7 Tage unbehandelten Monozyten, gefolgt von M1-Makrophagen die höchste Aufnahmerate zeigten (Abb.18A+B). Interessanterweise zeigten lediglich die Immunzellen nach Normalisierung auf die hinzugegebene miR-Menge eine durch KLF2-Überexpression der Mikrovesikel-Spenderzellen erhöhte Aufnahme (Abb.18B). Die Aufnahmerate bestätigt die zuvor gezeigten Ergebnisse und deckt zusätzlich den wahren Zusammenhang zwischen einer vorangegangenen KLF2-Transduktion der Vesikel-Spenderzellen und der Aufnahme ihrer Vesikel auf.

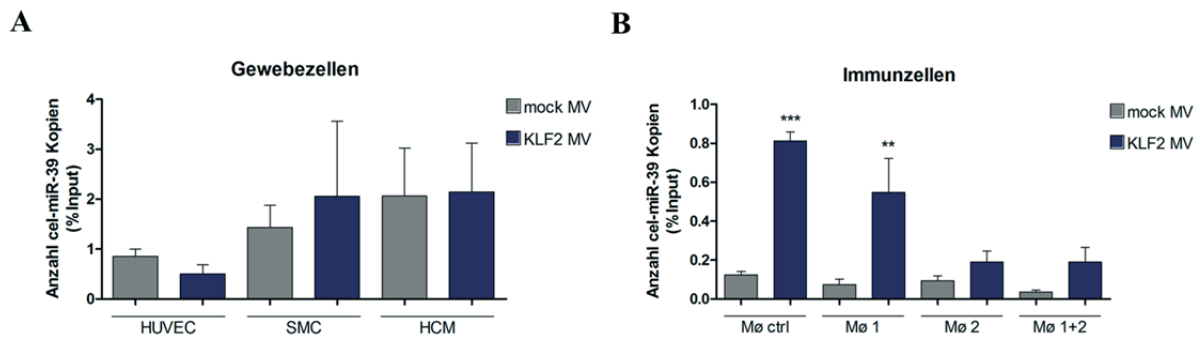


Abb. 18: Kardiomyozyten und vaskuläre glatte Muskelzellen sowie unbehandelte Monozyten und M1-Makrophagen zeigen die höchsten Aufnahmeraten von cel-miR-39, wobei nur innerhalb der Immunzellen KLF2-Mikrovesikel eine höhere Transfereffektivität zeigen als mock-Mikrovesikel.

(A) Aufnahme berechnet nach oben genannter Formel (Formel 6). Anzahl der cel-miR-39-Kopien innerhalb der Gewebezellen, die zuvor für 24 h mit cel-miR-39-beladenen MV von mock- bzw. KLF2-transduzierten HUVECs inkubiert wurden, im Verhältnis zur Anzahl der insgesamt in MV hinzugegebenen cel-miR-39-Kopien; n=5-7. (B) Aufnahme berechnet nach oben genannter Formel (Formel 6). Anzahl der cel-miR-39-Kopien innerhalb der Immunzellen, die nach 6-tägiger Differenzierung zu Makrophagen (inkl. Polarisierung zu M1- oder M2-Makrophagen bzw. einer gemischten Population) für 24 h mit cel-miR-39-beladenen MV von mock- bzw. KLF2-transduzierten HUVECs inkubiert wurden, im Verhältnis zur Anzahl der insgesamt in MV hinzugegebenen cel-miR-39-Kopien; n=3. Alle dargestellt als Prozentanteil des jeweiligen cel-miR-39-Gehalts der zugegebenen mock- bzw. KLF2-MV. Signifikanzen beziehen sich auf die, der jeweiligen Zellart zugehörige, Kontroll-Kondition (mock). Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass der Transfer von cel-miR-39 sowohl über mock- als auch KLF2-Mikrovesikel in alle unterschiedlichen Empfängerzellarten erfolgreich stattfindet (Abb.16A+B). Dabei wiesen die mit KLF2-Mikrovesikeln behandelten Zellen in allen Fällen erhöhte relative Level an cel-miR-39 auf (Abb.16C+D), was nicht an einem unterschiedlichen Export aus den Spenderzellen in die Mikrovesikel lag (Abb.17), sondern vielmehr daran, dass in den Spenderzellen bereits 72 h nach Transfektion ein 6-fach erhöhter cel-miR-39-Level vorlag, der sich so in den Mikrovesikeln fortsetzte (Abb.15C+E).

Es bestehen zellartspezifische Unterschiede in der Effektivität des Transfers der cel-miR-39-beladenen endothelialen Mikrovesikel. Vaskuläre glatte Muskelzellen, Kardiomyozyten und die unbehandelten Monozyten wiesen nach Inkubation mit den

Mikrovesikeln einen im Vergleich zu Endothelzellen und Makrophagen höheren cel-miR-39-Level auf (Abb.16A+B). Weiterhin konnte demonstriert werden, dass die Aufnahmerate der Immunzellen durch KLF2 verstärkt wird, was in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten jedoch nicht beobachtet werden konnte (Abb.18A+B).

3.1.2 Mikrovesikel von mock/KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen transferieren die exogene microRNA cel-miR-39 *in vitro* in mononukleäre Zellen der Milz von C57BL/6J Mäusen

In der Entwicklung und dem Fortschreiten der Atherosklerose wird der Milz (latein. *lien*) eine bedeutende Rolle zugesprochen³⁸. Als Vorversuch zum Atherosklerose-Modell wurde daher das folgende Transfer-Experiment durchgeführt, um die Frage zu beantworten, ob es *in vitro* möglich ist, cel-miR-39 über extrazelluläre Vesikel von Endothelzellen in mononukleäre Zellen (engl. *mononuclear cells*, MNCs) der murinen Milz (= Splenozyten) zu transportieren und welchen Effekt KLF2 auf diesen Transfer hat.

Da eine andere Studie dieser Arbeitsgruppe zeigen konnte, dass die Injektion von KLF2-Mikrovesikeln im murinen Atherosklerose-Modell die Gesamtfläche der atherosklerotischen Läsionen in den Gefäßen signifikant zu reduzieren vermochte⁷⁵, sollte im Verlauf dieser Arbeit zusätzlich die Frage geklärt werden, ob diese positiven biologischen Effekte der Mikrovesikel über die mononukleären Zellen der Milz vermittelt wurden.

Murine Endothelzellen (mECs) wurden lentiviral erfolgreich mit KLF2 transduziert (Abb.20A) und anschließend mit cel-miR-39 transfiziert (Abb.20B+C). In den nach 72 h isolierten KLF2-Mikrovesikeln lag bei Messung der cel-miR-39 per real-time PCR nur ein leicht erhöhter cel-miR-39-Level im Vergleich zu mock-Mikrovesikeln vor (Abb.20D+E), was im Gegensatz zu den entsprechenden Vesikeln von humanen Endothelzellen im vorherigen Versuch stand (Abb.15D+E).

Die zuvor aus Zellsuspensionen der Milz von C57BL/6J Mäusen aufgereinigten Splenozyten wurden für 24 h mit den cel-miR-39-beladenen mock- und

KLF2-Mikrovesikeln inkubiert. Im Vergleich zur Kontrollkondition (PBS) wurde die miR durch beide Mikrovesikel-Arten effektiv in die Splenozyten transferiert, wobei die KLF2-Vesikel eine signifikant höhere Transfereffektivität zeigten (Abb.19).

Aus diesem Versuch lässt sich schließen, dass es *in vitro* möglich ist, miRs über extrazelluläre Vesikel von murinen mock- oder KLF2-transduzierten Endothelzellen in murine Splenozyten zu transferieren und dass dabei ein signifikanter Unterschied zwischen mock- und KLF2-Mikrovesikeln besteht.

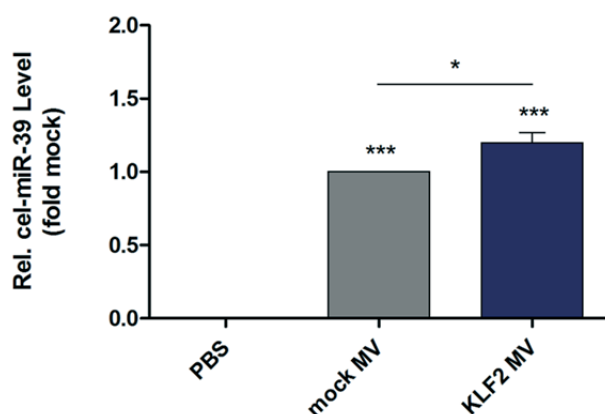


Abb. 19: Mikrovesikel von KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen transferieren *in vitro* signifikant mehr cel-miR-39 in Splenozyten von C57BL/6J Mäusen als mock-Mikrovesikel.

Relativer cel-miR-39-Level in zuvor aus Milzen von C57BL/6J Mäusen aufgereinigten MNCs. Aufreinigung über Dichtegradienten, anschließend 24 h Inkubation mit cel-miR-39-beladenen MV von mock- bzw. KLF2-transduzierten mECs. Signifikanzen beziehen sich, soweit nicht anders angezeigt, auf die Kontroll-Kondition PBS. n=3. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

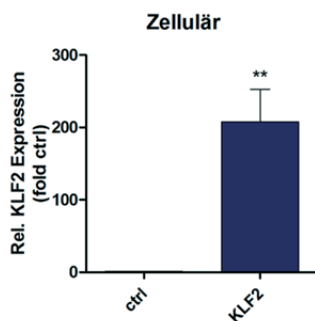
3.2 Transfer der mit cel-miR-39 beladenen Mikrovesikel von murinen Endothelzellen in unterschiedliche Gewebe von Kontrollmäusen

Für die folgenden *in vitro*- und *in vivo*-Versuche wurden murine Zellen und der murine Organismus (*Mus musculus*) verwendet. Dabei generierten murine Endothelzellen Mikrovesikel, die nach Isolation aus dem Zellkultur-Überstand schließlich auf murine Empfängerzellen gegeben oder in die Maus injiziert wurden. Auch hier wurden die Mikrovesikel-Spenderzellen stets mit dem KLF2-Vektor transduziert, was zu einer erhöhten Expression von KLF2 im Vergleich zur Kontrolle (mock-transduziert) führte

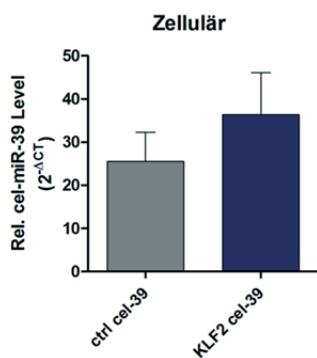
(Abb.20A). Anschließend konnten die Zellen sowohl der Kontroll- als auch der KLF2-Kondition erfolgreich mit cel-miR-39 transfiziert werden (Abb.20B+C) und beluden ihrerseits die Mikrovesikel ebenfalls mit dieser miR (Abb.20D+E).

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt für die Spenderzellen und Mikrovesikel als $2^{-\Delta CT}$ bzw. 2^{-CT} (MV), um zu zeigen, dass ein ausreichend hoher Level an cel-miR-39 vorliegt und zusätzlich als fold mock, um den Unterschied zwischen mock und KLF2 deutlicher herauszustellen.

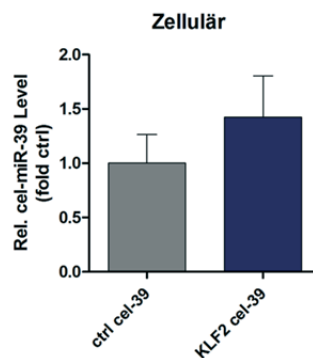
A



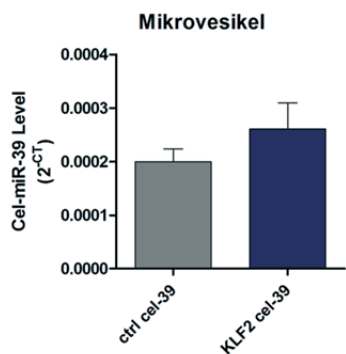
B



C



D



E

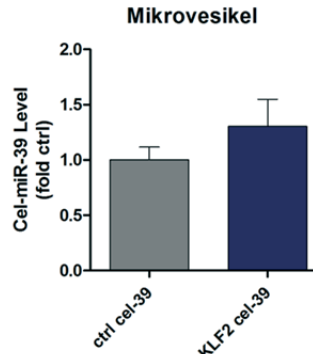


Abb. 20: KLF2-Transduktion der murinen Endothelzellen, sowie nach zusätzlicher Transfektion mit cel-miR-39 intrazellulär und in den Mikrovesikeln leicht erhöhte cel-miR-39-Level als in Kontrollen (mock).

(A) Überexpression von KLF2 in mECs, 10 Tage nach lentiviraler Transduktion mit KLF2. Kontrolle waren untransduzierte mECs (ctrl); n=5-8. (B) Relativer cel-miR-39-Level in untransduzierten und KLF2-transduzierten mECs, 72 h nach Transfektion mit 100 nM rekombinanter cel-miR-39, (C) zusätzlich dargestellt im Verhältnis zu untransduzierten mECs; n=6-10. (D) Cel-miR-39-Level in von untransduzierten oder KLF2-transduzierten mECs produzierten MV, (E) zusätzlich dargestellt im Verhältnis zu MV von untransduzierten mECs; n=7-12.

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.2.1 Mikrovesikel von KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen sind nach intravenöser Injektion *in vivo* nicht in der Lage, cel-miR-39 in nicht aktiviertes Gewebe zu transferieren

Da in den Vorversuchen *in vitro* der erfolgreiche Transfer der cel-miR-39 in alle untersuchten Zellarten gezeigt werden konnte, schloss sich die Frage an, ob cel-miR-39 auch *in vivo* über extrazelluläre Vesikel in verschiedene Gewebe der Maus transportiert werden kann.

Dabei wurden gesunde, 12 Wochen alte, männliche C57BL/6J Mäuse verwendet, die 24 h vor Tötung und Organentnahme entweder PBS (Kontrolle) oder die von KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen stammenden Mikrovesikel per Injektion in die Schwanzvene erhielten (2.2.5.2).

Da es sich um einen Vorversuch zum akuten Myokardinfarkt-Modell handelte wurden Herz, Aorta und deren Intima untersucht. Der cel-miR-39-Gehalt wurde außerdem in Leber und Niere bestimmt, da es sich bei ihnen um Organe handelt, die in der Lage sind, das periphere Blut zu filtern bzw. Stoffe aus dem Blut zu metabolisieren und zu entsorgen. Um herauszufinden, inwieweit die Vesikel bereits aufgenommen oder herausgefiltert wurden, wurde außerdem der cel-miR-39-Level im peripheren Blut gemessen.

In allen Fällen wurde der cel-miR-39-Level per real-time PCR bestimmt und die Ergebnisse sind als $2^{-\Delta CT}$ (Abb.21A) und zusätzlich normalisiert auf die jeweiligen PBS-Kontrolltiere (fold PBS) dargestellt (Abb.21B). Dabei ist zu beachten, dass jedes Tier ins Verhältnis des zur jeweiligen Versuchsreihe gehörenden PBS-Mittelwertes gesetzt wurde. Dadurch kommt der Standardfehler innerhalb der mit PBS injizierten Tiere zustande und die Ergebnisse können sich zum Teil stark von den Unnormalisierten unterscheiden (Abb.21A+B).

In den unnormalisierten Ergebnissen fällt zunächst eine starke Schwankung des cel-miR-39-Levels innerhalb der Kontroll-Kondition (PBS) auf (Abb.21A). Keines der untersuchten Organe wies nach Injektion der KLF2-Mikrovesikel einen Anstieg des

cel-miR-39-Levels auf (Abb.21B). Jedoch konnte 24 h nach KLF2-Mikrovesikel-Injektion im peripheren Blut ein, im Vergleich zur Kontroll-Kondition, signifikant erhöhter cel-miR-39-Level gemessen werden (Abb.21B). Auch die Leber zeigte im Trend, allerdings erst nach Normalisierung, eine Erhöhung des miR-Levels nach KLF2-Mikrovesikel-Injektion (Abb.21B).

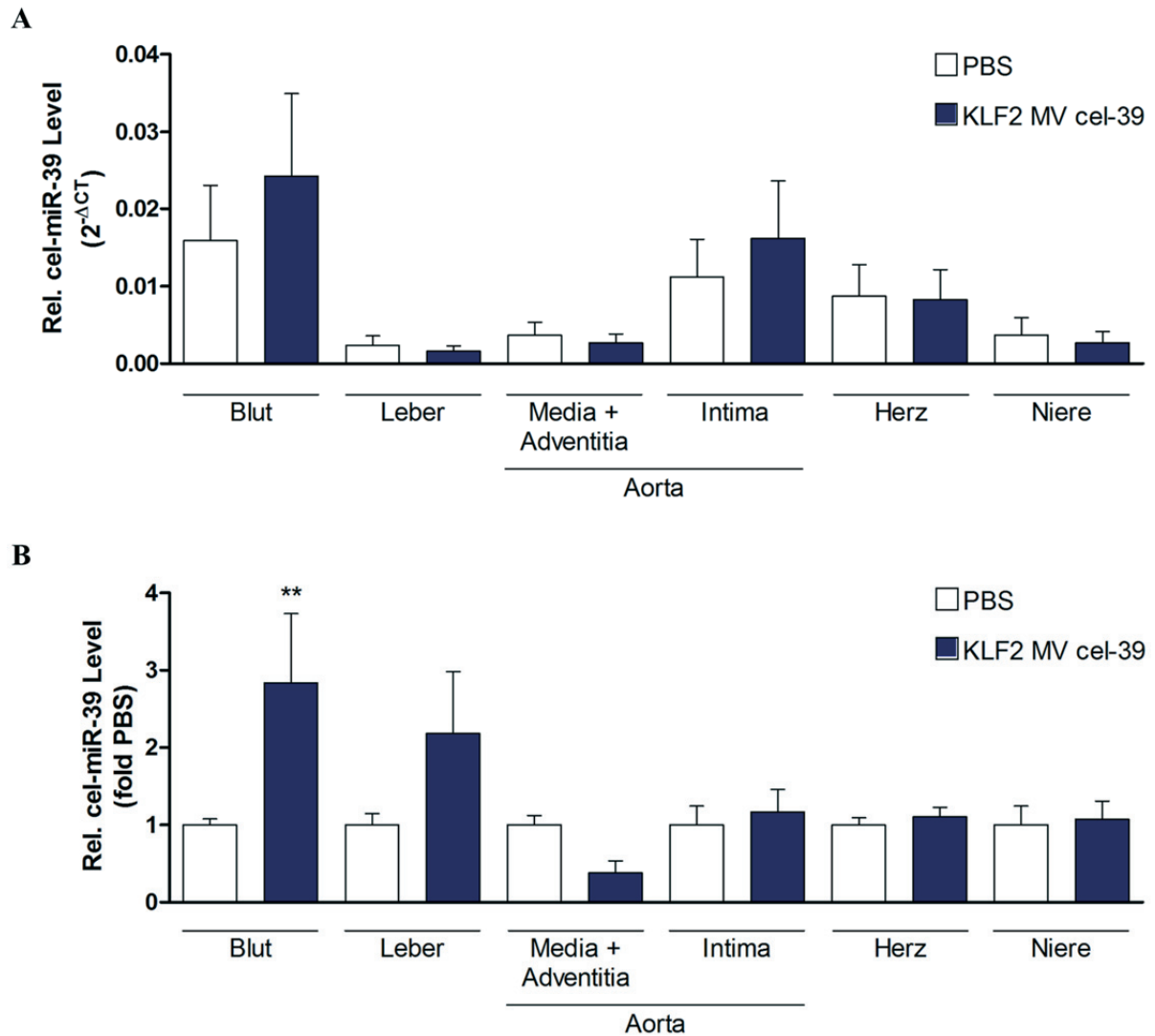


Abb. 21: Lediglich im peripherem Blut signifikant erhöhter cel-miR-39-Level nach Injektion von cel-miR-39-beladenen Mikrovessikeln von KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen.

(A) Relative cel-miR-39-Level in unterschiedlichen Organen von C57BL/6J Mäusen zum Zeitpunkt 24 h nach Injektion der cel-miR-39-beladenen MV, die von KLF2-transduzierten mECs stammten. Untersuchte Organe/Kompartimente: Peripheres Blut, Leber, Aorta bestehend aus Media/Adventitia und Intima, Herz, Niere; n=6. (B) Zusätzlich dargestellt im Verhältnis zu der dem jeweiligen Organ zugehörigen Kontroll-Kondition (PBS), wobei jedes Tier auf den PBS Mittelwert der jeweiligen Versuchsreihe normalisiert wurde; n=6. Signifikanzen beziehen sich auf die jeweilige Kontroll-Kondition (PBS). Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

3.2.2 Die Milz von gesunden C57BL/6J Mäusen zeigt nach intravenöser Injektion der Mikrovesikel von murinen Endothelzellen lediglich einen minimalen Anstieg an cel-miR-39

Als Vorversuch zum Atherosklerose-Modell wurden in diesem Experiment die mit cel-miR-39 beladenen Mikrovesikel intravenös (i.v.) zunächst in gesunde C57BL/6J Mäuse injiziert. 24 h später erfolgte die Tötung der Tiere mit anschließender Organentnahme. Als Kontrolle dienten C57BL/6J Mäuse ohne Injektion (ctrl).

Die cel-miR-39 war hier zusätzlich mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert, sodass die Aufnahme der mit cel-miR-39 beladenen Mikrovesikel nach Messung per real-time PCR durch die Histologie hätte bestätigt werden können. Die Ergebnisse der real-time PCR werden zum einen als $2^{-\Delta CT}$ und zusätzlich normalisiert auf die Kontrolltiere der jeweiligen Versuchsreihe (fold ctrl) dargestellt. Außerdem wurde bei diesem Versuch zusätzlich zu den bisherigen Organen auch die Milz untersucht, da sie als Teil des lymphatischen Systems in der Atherogenese von Bedeutung ist³⁸.

Grundsätzlich konnte in Milz, Niere, Leber, Media & Adventitia der Aorta, Intima der Aorta und Herz kein erfolgreicher Transfer der cel-miR-39 gezeigt werden (Abb.22A+B). Dagegen zeigte das periphere Blut im Vergleich zur Kontrolle einen beinahe 2-fach erhöhten cel-miR-39-Level nach Mikrovesikel-Injektion (Abb.22B). Das Ausmaß des Transfers reichte somit nicht, um den an cel-miR-39 gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Cy3 in der Milz darzustellen.

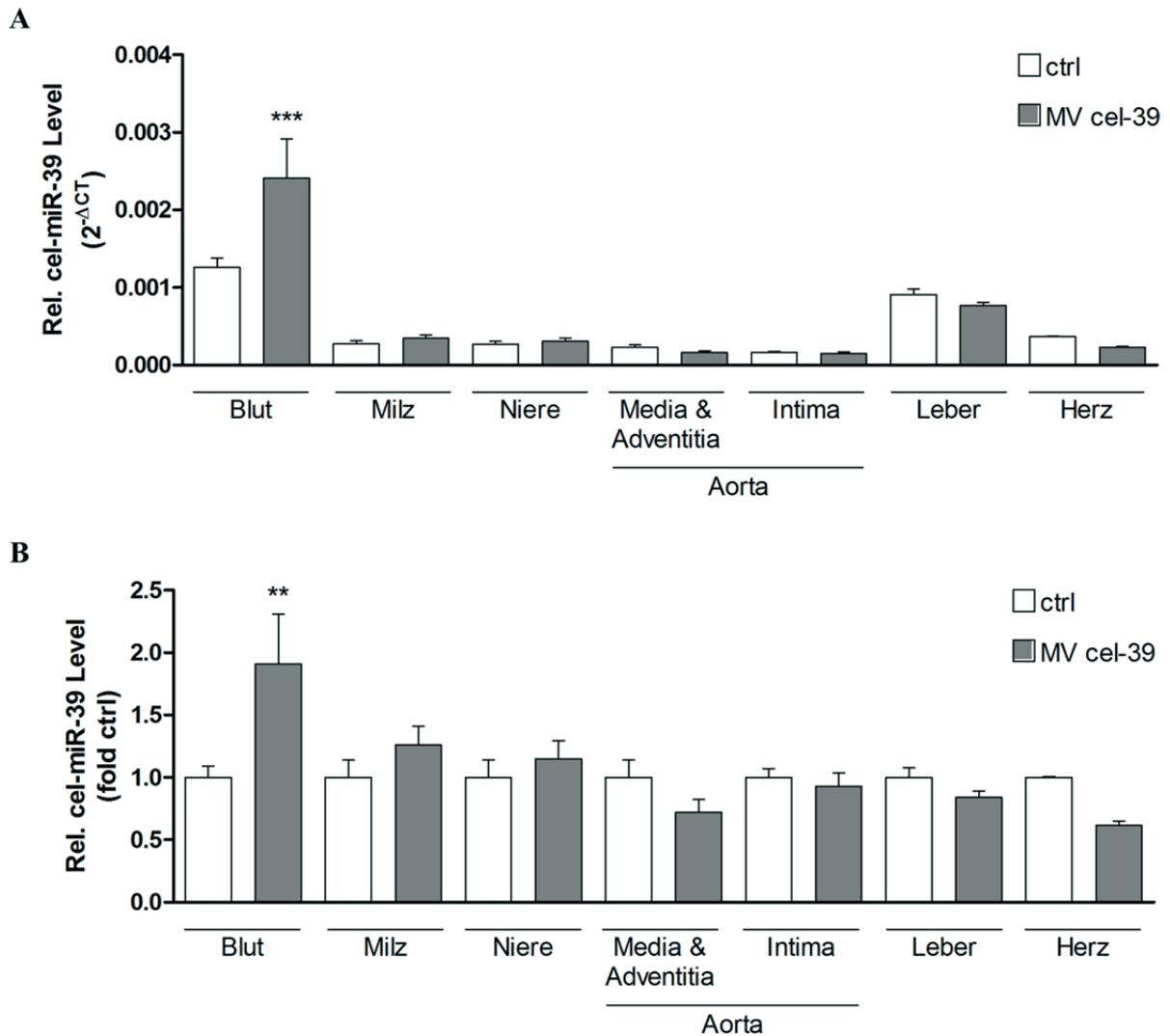


Abb. 22: Lediglich in peripherem Blut erhöhter cel-miR-39-Level nach Injektion von cel-miR-39-beladenen Mikrovesikeln von untransduzierten murinen Endothelzellen.

(A) Relative cel-miR-39-Level in unterschiedlichen Organen von C57BL/6J Mäusen zum Zeitpunkt 24 h nach Injektion der cel-miR-39-beladenen MV, die von untransduzierten mECs stammten. Untersuchte Organe/Kompartimente: Peripheres Blut, Milz, Niere, Aorta bestehend aus Media/Adventitia und Intima, Leber, Herz. (B) Zusätzlich dargestellt im Verhältnis zu der dem jeweiligen Organ zugehörigen Kontroll-Kondition (ctrl), wobei jedes Tier auf den ctrl-Mittelwert der jeweiligen Versuchsreihe normalisiert wurde. PBS-Kontrolltiere n=2; MV-injizierte Tiere n=3. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Mikrovesikel und mit ihnen cel-miR-39 von keinem Organ der gesunden Mäuse in signifikantem Maße aufgenommen wurden (Abb.22B). Im Blut jedoch konnte 24 h nach Injektion ein signifikant erhöhter cel-miR-39-Level gemessen werden (Abb.22B).

3.3 Transfer von cel-miR-39-beladenen, endothelialen Mikrovesikeln in zwei unterschiedlichen Krankheitsmodellen

Die Ergebnisse des in 3.2.1 (Abb.21A+B) beschriebenen Versuches konnten belegen, dass in gesunde C57BL/6J Mäuse injizierte KLF2-Mikrovesikel die in ihnen transportierte cel-miR-39 nur unzureichend in die untersuchten Organe transferierten. Diese Beobachtung konnte im Versuch 3.2.2 nach Injektion von normalen Mikrovesikeln für alle dort untersuchten Organe bestätigt werden (Abb.22A+B). Es stellte sich also die Frage, ob die Mikrovesikel samt der in ihnen transportierten cel-miR-39 generell besser von aktivierten Geweben aufgenommen werden würden, wie z.B. in Krankheitsmodellen. Die Entscheidung fiel hierbei auf zwei verschiedene Modelle, zum einen das des akuten Myokardinfarktes (2.2.5.3) und zum anderen das Atherosklerose-Modell in ApoE^{-/-} Mäusen (2.2.5.4), die beide auf unterschiedliche Weise durch eine systemische Entzündungsreaktion eine „Aktivierung“ des Organismus zur Folge haben.

3.3.1 Transfer im murinen Myokardinfarkt-Modell

Im murinen Myokardinfarkt-Modell wird durch Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA; engl. *left anterior descending artery*, LAD) der *Arteria coronaria sinistra* (engl. *left coronary artery*, LCA) ein akuter Myokardinfarkt (engl. *acute myocardial infarction*, AMI) mit Ischämie des Myokards in den distal des Verschlusses gelegenen Versorgungsgebieten hervorgerufen, wodurch es im betroffenen Gewebe zu Apoptose und Nekrose von Kardiomyozyten, Fibroblasten und Endothelzellen kommt. Im Grenzgebiet zwischen Infarkt und gesundem Myokard findet während Umbauprozessen eine Entzündungsreaktion statt, die zusätzlich zu einer systemischen, inflammatorischen Reaktion des Endothels führt³⁹.

Bei diesen Versuchen wurden also C57BL/6J Mäuse verwendet, die eine durch vorherige Induktion des akuten Myokardinfarktes hervorgerufene lokale und systemische inflammatorische Aktivierung aufwiesen. Um eine möglichst genaue Aussage über die gemessenen miR-Level in den Herzen zu erhalten, wurden diese bei Organentnahme über visuelle Einschätzung (Infarkt-Bereich blass, daher gut abgegrenzt) in 3 Bereiche

unterteilt: das vom Infarkt entlegene, nicht-infarzierte Gewebe (engl. *Remote-Zone*), die Grenzschicht zwischen *Remote-Zone* und Infarkt (engl. *Border-Zone*) und letztlich der Infarkt selbst (Infarkt-Zone) (Abb.23).

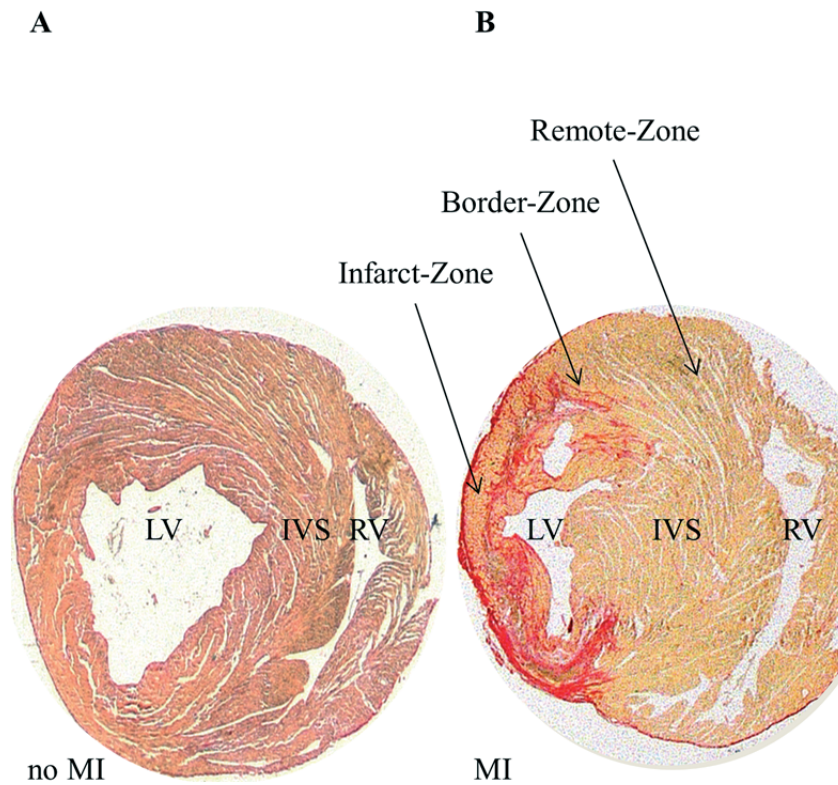


Abb. 23: Mikroskopische Aufnahme des Querschnitts durch das murine Herz mit und ohne Myokardinfarkt. Siriusrot-Färbung von kollagenhaltigem Bindegewebe in murinen Herzen mit und ohne Myokardinfarkt. Mittlere Höhe des linken Ventrikels. **(A)** Herz ohne akuten Myokardinfarkt. **(B)** Herz nach Induktion eines akuten Myokardinfarktes. LV, linker Ventrikel; IVS, Interventrikuläres Septum; RV, rechter Ventrikel. Kollagen deutlich rot angefärbt.

3.3.1.1 Mikrovesikel von KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen transferieren cel-miR-39 *in vivo* nur geringfügig in durch akuten Myokardinfarkt aktiviertes Gewebe

Die im Vorversuch (3.2.1) verwendeten gesunden C57BL/6J Mäuse wiesen nach einmaliger Injektion von KLF2-Mikrovesikeln, im Gegensatz zu allen untersuchten Organen, lediglich einen erhöhten cel-miR-39-Level im peripheren Blut auf (Abb.21A+B). In dem nun folgenden Versuch wurden C57BL/6J Mäuse nach Myokardinfarkt-Induktion mit murinen endothelialen mock- und KLF2-Mikrovesikeln injiziert, deren Spenderzellen zuvor erfolgreich mit cel-miR-39 transfiziert worden waren (Abb.20B+C). Als Kontrolle diente eine Injektion von PBS in ebenfalls operierte Mäuse. 24 h nach Induktion des Myokardinfarktes erfolgte die Injektion der

Vesikel in die *Vena caudalis*, die Schwanzvene. Nach weiteren 24 h wurden die Mäuse mit anschließender Organentnahme getötet und der Level an cel-miR-39 in den verschiedenen Geweben wurde per real-time PCR ermittelt.

Nach intravenöser Injektion von KLF2-Mikrovesikeln zeigten sich in der *Border*-Zone, der aortalen Intima und der Leber leichte Trends eines erhöhten cel-miR-39-Levels im Vergleich zu mock-Mikrovesikel-behandelten Tieren (Abb.24B,E,F). Bei ähnlichem Level der miR in den injizierten mock- und KLF2-Mikrovesikeln (Abb.20D+E), könnte dies für eine etwas bessere Aufnahme der KLF2-Mikrovesikel in den entsprechenden Organen sprechen. Wie am Herzen exemplarisch zu sehen war, schien dabei die inflammatorische Aktivierung des Gewebes eine Rolle zu spielen. In *Remote*- und Infarkt-Zone konnten keine erhöhten miR-Level gemessen werden (Abb.24A+C), im Randgebiet des Infarktes hingegen, also dem Bereich, in dem man die höchste inflammatorische Aktivität erwarten konnte, war nach KLF2-Mikrovesikel-Injektion ein 2,2-fach erhöhter miR-Level im Vergleich zur Kontrolle feststellbar, der allerdings nicht signifikant war (Abb.24B). Im Vorversuch noch ohne erhöhte cel-miR-39-Level nach Mikrovesikel-Injektion (Abb.21A+B) wies die aortale Intima in diesem Versuchsaufbau einen nicht signifikanten leichten Anstieg nach KLF2-Mikrovesikel-Injektion auf (Abb.24E). Dieser Trend würde zu der Hypothese, dass die Aktivierung des Gewebes durch Inflammation Auswirkungen auf die Aufnahme von im Blut zirkulierenden Mikrovesikeln hat, passen.

Leber und Niere zeigten im Trend vor allem nach Injektion von KLF2-Mikrovesikeln die höchsten cel-miR-39-Level im Vergleich zur Kontrolle (Abb.24F+G), was darauf hindeuten könnte, dass ein Großteil der in die Blutzirkulation injizierten Mikrovesikel von diesen beiden Organen aus dem Blut gefiltert wurde.

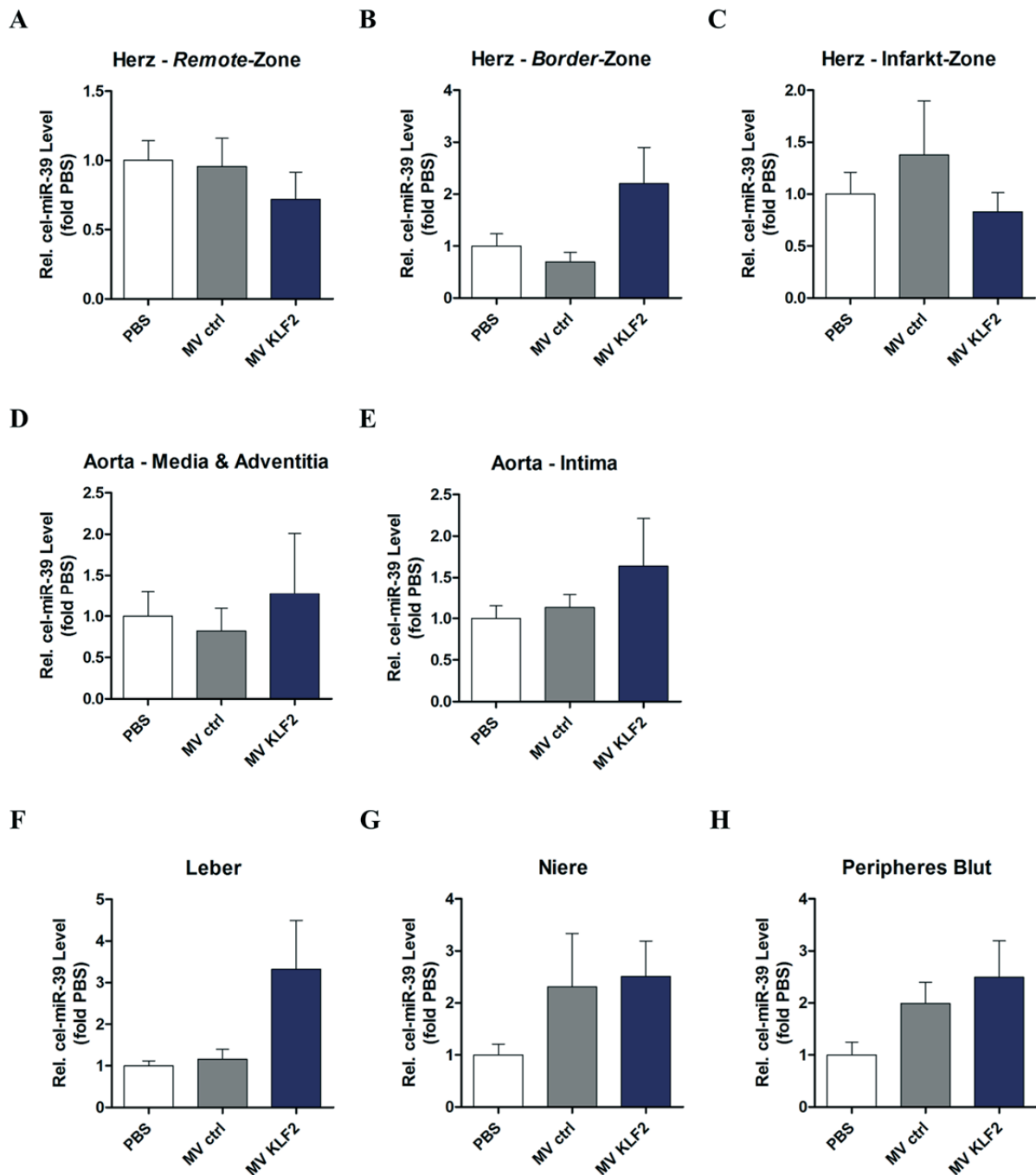


Abb. 24: Die Aufnahme von KLF2-Mikrovesikeln und in ihnen enthaltener cel-miR-39 ist in Geweben von C57BL/6J Mäusen, die zuvor durch akuten Myokardinfarkt aktiviert wurden, nur geringfügig erhöht.

Relative cel-miR-39-Level in unterschiedlichen Organen von C57BL/6J Mäusen, die 24 h nach Induktion eines akuten Myokardinfarktes mit cel-miR-39-beladenen MV injiziert wurden. Diese stammten dabei von untransduzierten oder KLF-transduzierten und cel-miR-39-transfizierten mECs, als Kontrolle wurde PBS injiziert. Die Organentnahme erfolgte wiederum 24 h nach MV-Injektion. Untersuchte Organe/Kompartimente: **(A)** Herz – *Remote-Zone*, **(B)** Herz – *Border-Zone*, **(C)** Herz – *Infarkt-Zone*, **(D)** Aorta bestehend aus Media/Adventitia und **(E)** Intima, **(F)** Leber, **(G)** Niere,

(H) Peripheres Blut. n=9-11. Dargestellt im Verhältnis zur Kontroll-Kondition (PBS). Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

3.3.1.2 Mikrovesikel von KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen sind *in vivo* nicht in der Lage, die endogene miR-92a in durch akuten Myokardinfarkt aktiviertes Gewebe von miR-92a^{-/-} Mäusen zu transferieren

Die im vorherigen Versuch (3.3.1.1) in allen Organen niedrigen cel-miR-39-Level warfen als nächstes die Frage auf, ob innerhalb der 24 h nach Mikrovesikel-Injektion ein Großteil der darin befindlichen, vom Nematoden *C. elegans* stammenden, miR bereits vom Organismus der Maus als fremd erkannt und daher abgebaut worden war. Es folgte daher eine Wiederholung des Versuches mit ähnlichem Aufbau, wobei statt C57BL/6J Mäusen nun miR-92a^{-/-} Mäuse verwendet wurden, die 24 h nach Myokardinfarkt-Induktion mit Mikrovesikeln injiziert wurden. Diese stammten von KLF2-transduzierten und mit miR-92a transfizierten murinen Endothelzellen. Bei der hier verwendeten miR-92a handelte es sich um eine murine miR, sodass sie im Vergleich zur *C. elegans*-miR von den Mäusen nicht als fremd erkannt werden konnte. 24 h nach der Injektion wurden die Mäuse getötet, die entsprechenden Organe entnommen und deren miR-92a-Gehalt per real-time PCR bestimmt.

In keinem der 3 verschiedenen Abschnitte des Herzens (*Remote-Zone*, *Border-Zone*, *Infarkt-Zone*) konnte ein im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöhter miR-92a-Level gemessen werden (Abb.25A,B,C). Die Aorta (bestehend aus Media & Adventitia) zeigte als einziges Organ einen signifikant erhöhten miR-92a-Level (Abb.25D), wohingegen interessanterweise in der aortalen Intima kein erhöhter Level festgestellt werden konnte (Abb.25E). In der Leber lag ein nicht signifikant erhöhter miR-92a-Level vor (Abb.25F), was an ihrer metabolischen Aktivität und der Fähigkeit Stoffe aus dem Blut aufzunehmen und zu entsorgen liegen könnte. Das periphere Blut zeigte keine Erhöhung des miR-Levels nach Mikrovesikel-Injektion (Abb.25H). Die Ergebnisse demonstrieren somit, dass die miR-92a^{-/-} Mäuse die Mikrovesikel mit muriner miR-92a nicht besser aufnehmen, als C57BL/6J Mäuse die Mikrovesikel mit cel-miR-39.

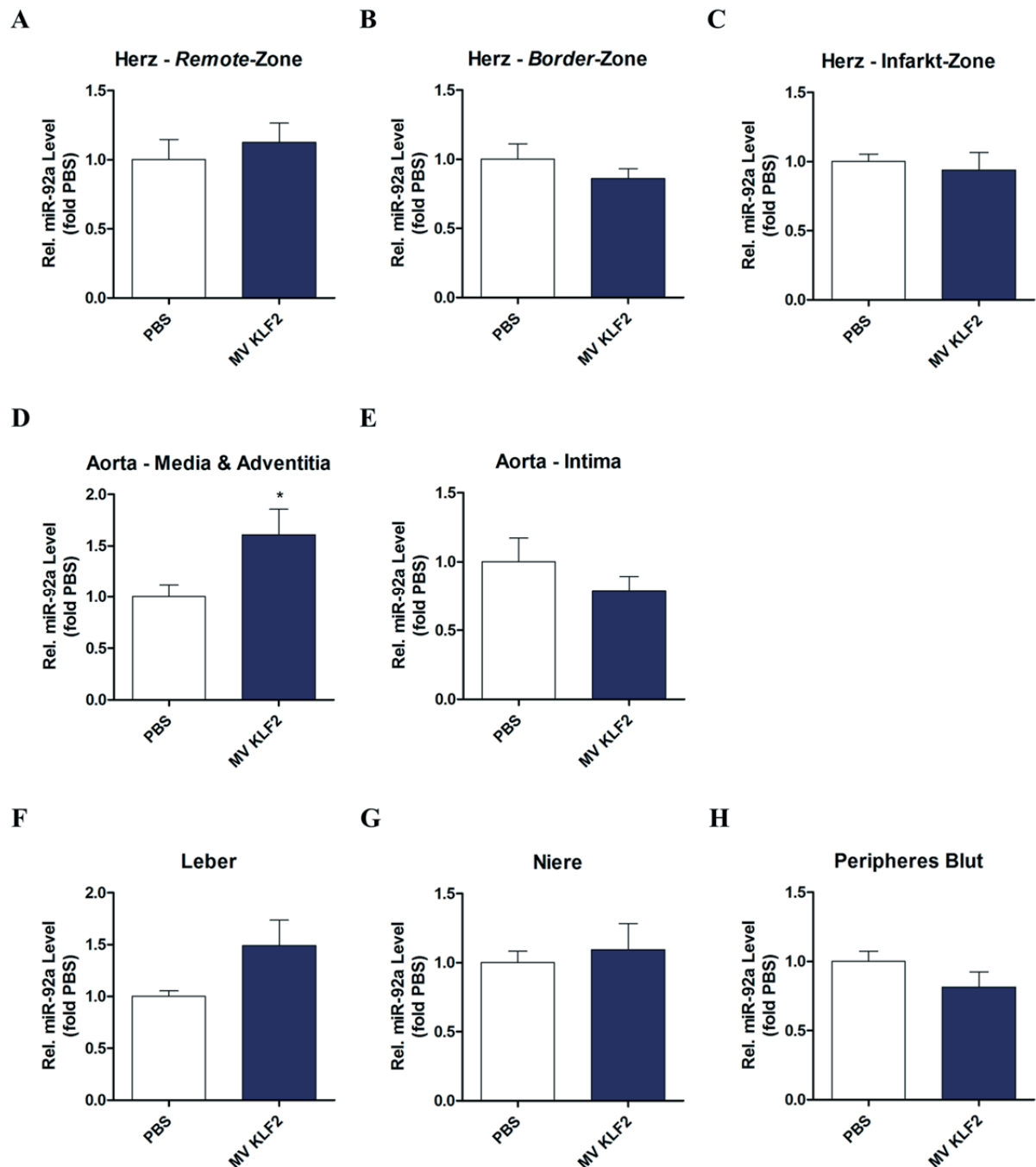


Abb. 25: Lediglich die Aorta (Media & Adventitia) von $\text{miR-92a}^{-/-}$ Mäusen mit akutem Myokardinfarkt zeigte eine Aufnahme der miR-92a-beladenen Mikrovesikel von KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen.

Relative miR-92a-Level in unterschiedlichen Organen von $\text{miR-92a}^{-/-}$ Mäusen, die 24 h nach Induktion eines akuten Myokardinfarktes mit miR-92a-beladenen MV injiziert wurden. Diese stammten dabei von KLF2-transduzierten, miR-92a-transfizierten mECs, als Kontrolle wurde PBS injiziert. Die Organentnahme erfolgte 24 h nach MV-Injektion. Untersuchte Organe/Kompartimente: **(A)** Herz – Remote-Zone, **(B)** Herz – Border-Zone, **(C)** Herz – Infarkt-Zone, **(D)** Aorta bestehend aus

Media/Adventitia und (E) Intima, (F) Leber, (G) Niere, (H) Peripheres Blut. n=10-11. Dargestellt im Verhältnis zur Kontroll-Kondition (PBS). Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. *p<0.05.

3.3.2 Transfer im murinen Atherosklerose-Modell

Das genetische Modell der ApolipoproteinE^{-/-}-Maus (ApoE^{-/-} Maus) dient der Induktion einer systemischen Atherosklerose. ApoE spielt als Komponente der Lipoproteine eine zentrale Rolle im Fettstoffwechsel und ein Defizit an ApoE führt somit zu Hyperlipidämie (Hyperlipoproteinämie) – einer der Risikofaktoren für Atherogenese. Durch eine fettreiche Diät wird dieser Vorgang beschleunigt. Die im Verlauf der Atherogenese hervorgerufene Dysfunktion des Endothels, wiederum ausgelöst durch Ablagerungen von fetthaltigen Substanzen (z.B. Cholesterol), führt zur Ausbildung multipler herdförmiger Veränderungen (*Plaques*) in den Arterienwänden, zu einer systemischen Inflammation und somit zu einem aktivierten Immunsystem^{17,35,38}.

In diesem Versuch erhielten die ApoE^{-/-} Mäuse eine 2-wöchige, stark fetthaltige Diät. Während dieser Zeit wurden jeweils 1 Mal pro Woche PBS oder Mikrovesikel von normalen oder KLF2-transduzierten (Abb.20A), cel-miR-39-transfizierten (Abb.20B+C) murinen Endothelzellen in die Schwanzvene injiziert, wobei die zweite Injektion 24 h vor dem Töten mit Organentnahme erfolgte.

3.3.2.1 Mikrovesikel von murinen Endothelzellen transportieren die exogene cel-miR-39 *in vivo* in die durch Atherosklerose aktivierte Milz

Auf die Rolle der Milz bei einer Inflammation wurde bereits hingewiesen. Bei einer systemischen Inflammation der Arterien stellt die Milz also eines der dadurch aktivierten Organe dar und könnte somit in der Atherosklerose von besonderer Bedeutung für die Aufnahme der Mikrovesikel sein. Wie im Vorversuch (3.1.2, Abb.19) gezeigt wurde, sind Mikrovesikel prinzipiell in der Lage, die in ihnen transportierte cel-miR-39 *in vitro* in die murinen mononukleären Zellen der Milz zu transferieren. Dies geschah unabhängig von einer vorangegangenen KLF2-Transduktion der murinen endothelialen Spenderzellen. Im darauffolgenden *in vivo*-Vorversuch konnte die Aufnahme der Mikrovesikel durch die Milz von C57BL/6J Mäusen ohne pathologi-

sche Veränderungen nicht gezeigt werden (Abb.22B). In diesem Versuch sollte daher erörtert werden, ob die Milzen von Mäusen mit einer systemischen Inflammation der Arterien eine höhere Aufnahme der Mikrovesikel aufweisen würden, als gesunde C57BL/6J-Kontrollmäuse (Abb.22B).

Herz, Aorta (Media & Adventitia) und aortale Intima zeigten hierbei keine deutlichen Unterschiede im cel-miR-39-Level zwischen den verschiedenen Gruppen und Konditionen (Abb.26A-C). Allenfalls in den Herzen der ApoE^{-/-} Tiere konnte ein leicht erhöhter Level im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden (Abb.26A). In der Leber lag innerhalb der ApoE^{-/-} Mäuse nach Injektion der Mikrovesikel von untransduzierten Endothelzellen ein signifikant erhöhter cel-miR-39-Level vor (Abb.26D). Im Vergleich dazu änderte sich der cel-miR-39-Level in der Leber der C57BL/6J Mäuse nach Mikrovesikel-Injektion nicht (Abb.26D).

Im peripheren Blut der C57BL/6J Mäuse konnte ein nicht signifikant erhöhter miR-Level nach Vesikel-Injektion gemessen werden (2,3-fach), was jedoch im peripheren Blut der ApoE^{-/-} Mäuse nicht feststellbar war (Abb.26F).

Die Milzen der C57BL/6J Mäuse wiesen einen ebenfalls nicht signifikanten 2,8-fach erhöhten cel-miR-39-Level nach Injektion von normalen Mikrovesikeln auf und folgten damit den Ergebnissen des Vorversuchs (Abb.26G). Interessant ist, dass die Milz der ApoE^{-/-} Mäuse nach Injektion der Mikrovesikel von untransduzierten Endothelzellen einen signifikant erhöhten cel-miR-39-Level (12-fach) zeigte (Abb.26G). Wenn auch nicht signifikant, so ging der Trend in den ApoE^{-/-} Mäusen nach KLF2-Mikrovesikel-Behandlung in dieselbe Richtung (Abb.26G). Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass die durch systemische Atherosklerose aktivierte Milz im Vergleich zur Milz des gesunden Organismus eine gesteigerte Mikrovesikel-Aufnahme-Aktivität zeigt. Nachdem die mononukleären Zellen der Milz (= Splenozyten) über einen Dichtegradienten isoliert wurden, konnte auch innerhalb dieser heterogenen Zellpopulation der cel-miR-39-Level bestimmt werden. In den Splenozyten der C57BL/6J und ApoE^{-/-} Mäuse konnte nach Injektion von cel-miR-39-beladenen Mikrovesikeln keine signifikante Veränderung des cel-miR-39-Levels nachgewiesen werden (Abb.26H). Zwar erhöhte sich der miR-Level nach Mikrovesikel-Injektion in beiden Maus-Stämmen leicht – hierbei

konnte der generelle Unterschied zwischen ihnen, wie er in der Messung der gesamten Milz vorlag, allerdings nicht beobachtet werden.

Gesondert hingewiesen werden muss auf den Fakt, dass innerhalb des Herzens und der aortalen Intima der C57BL/6J Mäuse die cel-miR-39-Level nach Injektion der miR-beladenen Mikrovessikel unter den in PBS-injizierten Tieren sanken (Abb.26A+C). Dies ist ein Anzeichen für einen hohen *Background* an cel-miR-39 in den Proben und deutet auf die insgesamt geringen Level an gemessener cel-miR-39 hin.

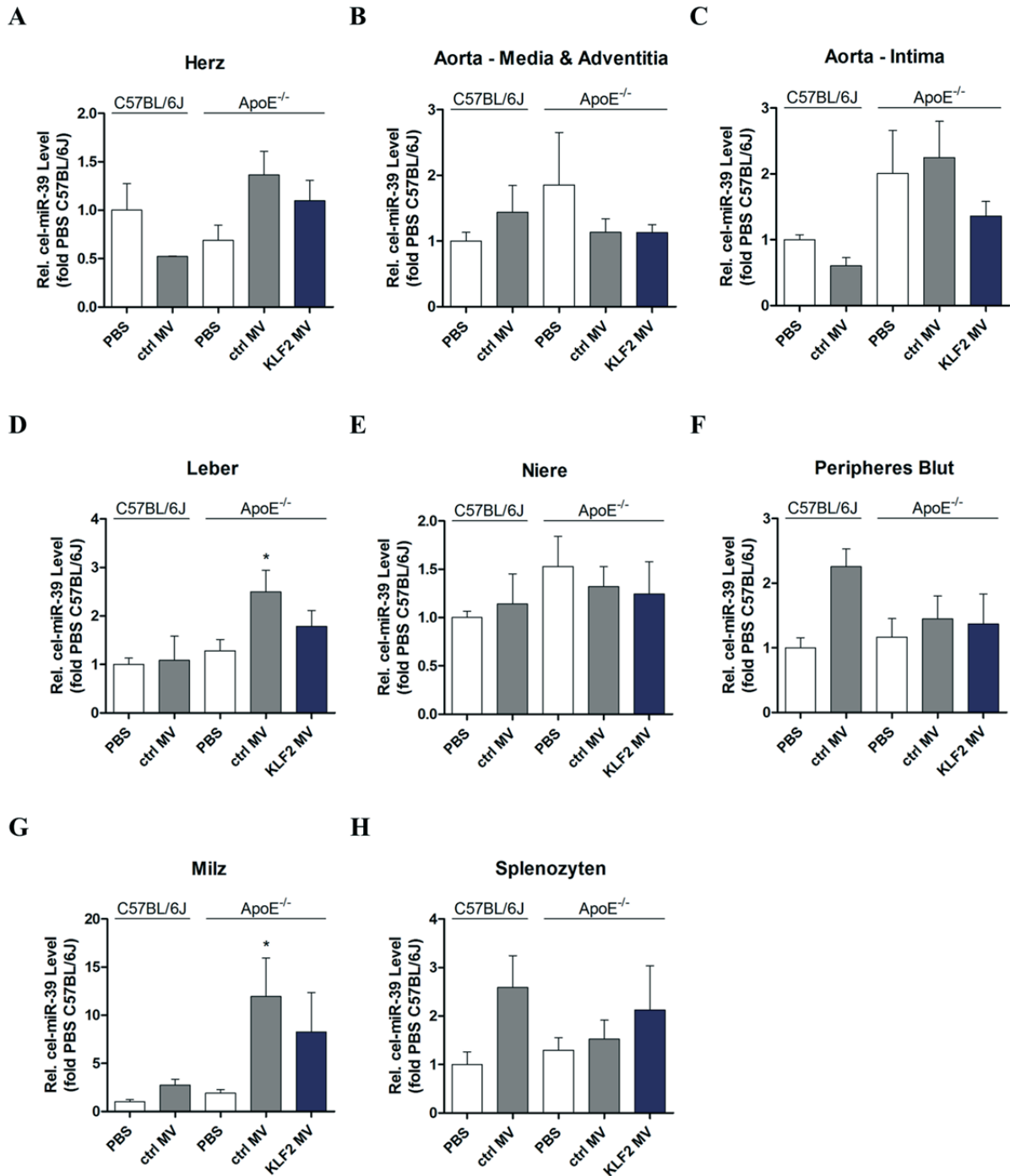


Abb. 26: Die Aufnahme von normalen Mikrovesikeln und in ihnen enthaltener cel-miR-39 ist in der Leber und vor allem der Milz von ApoE^{-/-} Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen signifikant erhöht.

Relative cel-miR-39-Level in unterschiedlichen Organen von C57BL/6J Mäusen und ApoE^{-/-} Mäusen, die innerhalb 2 aufeinanderfolgender Wochen jeweils 1 Mal mit cel-miR-39-beladenen MV injiziert wurden. Diese stammten dabei von untransduzierten oder KLF2-transduzierten, cel-miR-39-transfizierten mECs, als Kontrolle wurde PBS injiziert. Organentnahme erfolgte 24 h nach der zweiten MV-Injektion. ApoE^{-/-} Mäuse erhielten während der 2 Wochen eine stark fetthaltige Diät.

Untersuchte Organe/Kompartimente: **(A)** Herz, **(B)** Aorta bestehend aus Media/Adventitia und **(C)** Intima, **(D)** Leber, **(E)** Niere, **(F)** Peripheres Blut, **(G)** Milz, **(H)** MNCs der Milz.

C57BL/6J: PBS n=8, ctrl-MV n=3 (Splenozyten n=2), **ApoE^{-/-}**: PBS n=9, ctrl-MV n=8, KLF2-MV n=8. Dargestellt im Verhältnis zur Kontroll-Kondition (PBS) der C57BL/6J Mäuse. Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. *p<0.05.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die von untransduzierten Endothelzellen stammenden Mikrovesikel die in ihnen verpackte cel-miR-39 effektiver in die Leber und vor allem die Milz von atherosklerotisch und damit inflammatorisch aktivierten Mäusen transportierten. Es schließt sich die Frage an, ob die von untransduzierten und KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen stammenden Mikrovesikel *in vivo* in der Lage sind, an ihrem im Atherosklerose-Modell hauptsächlichen Aufnahmeort, der Milz, biologische Effekte zu bewirken.

3.3.3 Biologische Funktion der Mikrovesikel im murinen Atherosklerose-Modell

Als nächstes stellte sich die Frage, ob der von Hergenreider *et al.* gezeigte positive Effekt auf die Fläche der im Atherosklerose-Modell entstandenen Läsionen innerhalb der Arterienwände von ApoE^{-/-} Mäusen⁷⁵ durch biologische Effekte der Mikrovesikel auf die Milz erklärt werden könnte. Um festzustellen, ob und in welcher Art diese Effekte bestehen, wurde der Großteil der Splenozyten einer Durchflusszytometrie unterzogen. Bei diesem Verfahren kann die Struktur (v.a. Granularität), Volumen, Größe und Menge der untersuchten Zellen über Analyse ihrer Oberflächenbeschaffenheit und Oberflächenmarker bestimmt werden. Diese Methode dient daher der Analyse der unterschiedlichen Zelltypen in der untersuchten Zellsuspension.

3.3.3.1 Mikrovesikel von KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen reduzieren *in vivo* tendenziell den Anteil an M1-Makrophagen in der Milz von ApoE^{-/-} Mäusen

Um einen Einfluss der Mikrovesikel auf die Anzahl der unterschiedlichen Immunzellen wie T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und

neutrophilen Granulozyten in der Milz zu zeigen, wurde die Gesamtheit der mononukleären Zellen aus diesem Organ isoliert und anschließend einer Färbung mit Antikörpern unterzogen. Dadurch konnten im Durchflusszytometer die Anteile der genannten Zellarten an der Gesamtpopulation (P1) ermittelt werden (Abb.27).

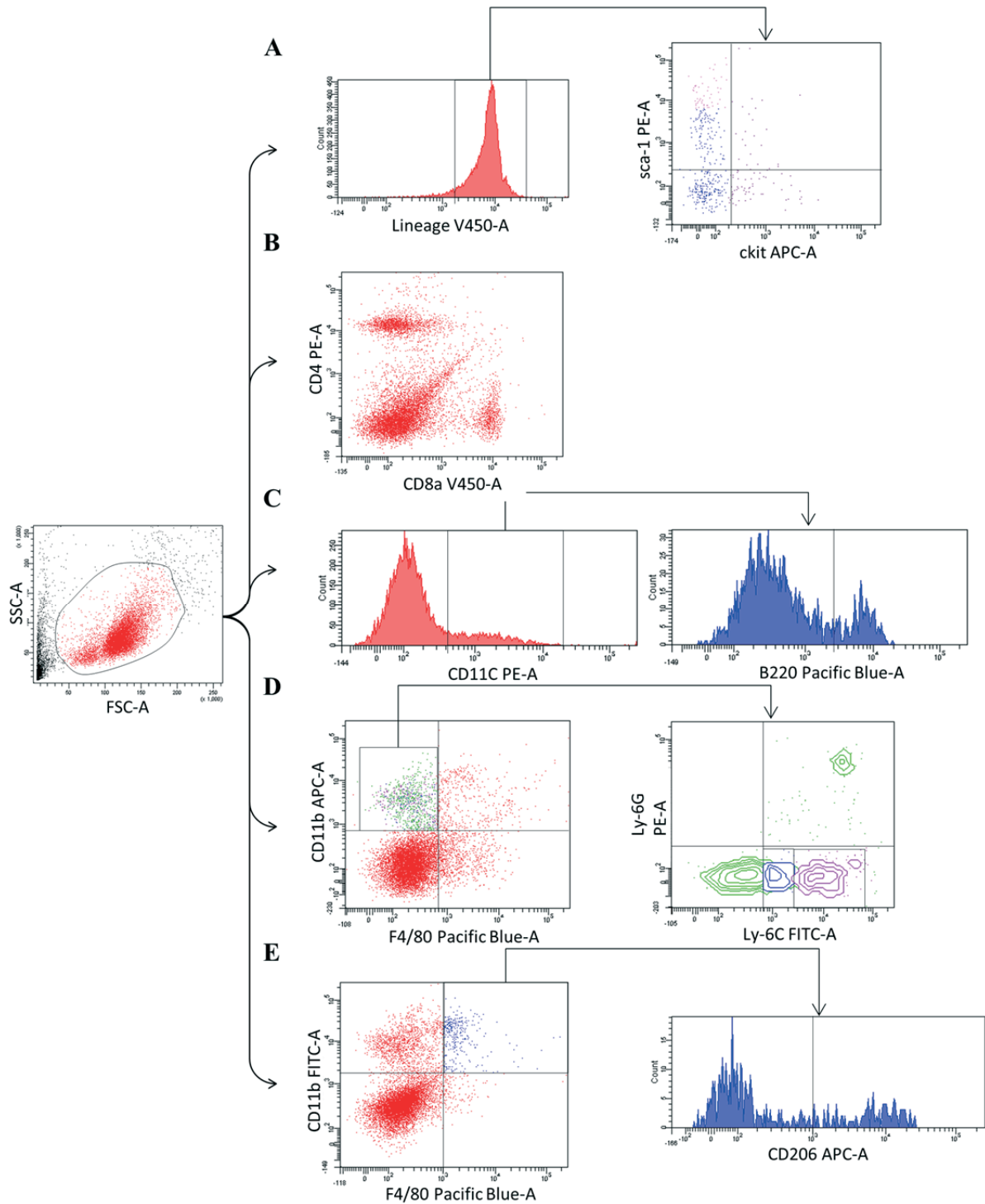


Abb. 27: Durchflusszytometrische Identifizierung verschiedener Immunzellen innerhalb der mononukleären Zellen der Milz von C57BL/6J und Apo^{-/-} Mäusen.

(A) Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen, definiert als Lin⁻, Sca-1⁺, c-Kit⁺. (B) T-Lymphozyten unterteilt in CD4⁺, CD8a⁻ und CD4⁻, CD8a⁺ T-Lymphozyten. (C) Dendritische Zellen definiert als CD11c⁺ und in CD11c⁺, B220⁺ plasmazytoide dendritische Zellen und CD11c⁺, B220⁻ klassische dendritische Zellen unterteilt. (D) Monozyten definiert als CD11b⁺, F4/80⁻ und in CD11b⁺, F4/80⁻, Ly-6C^{high} pro-inflammatorische Monozyten und CD11b⁺, F4/80⁻, Ly-6C^{low/med} anti-inflammatorische Monozyten unterteilt. Neutrophile Granulozyten definiert als CD11b⁺, F4/80⁻,

Ly-6G⁺. Ly-6C⁺. (E) Makrophagen definiert als CD11b⁺, F4/80⁺ und in CD11b⁺, F4/80⁺ CD206⁺ M1-Makrophagen und CD11b⁺, F4/80⁺ CD206⁻ M2-Makrophagen unterteilt.

Alle daraus hervorgegangenen Ergebnisse werden hier im Verhältnis zur Kontrollgruppe (PBS ctrl) gezeigt. Bei den hier mit „Lin⁻, sca-1⁺, c-Kit⁺“ angegebenen Zellen handelt es sich um hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs). Dieser Zelltyp war nach Behandlung mit Kontroll-Mikrovesikeln in beiden Maus-Stämmen nicht und bei den ApoE^{-/-} Mäusen nur nach KLF2-Mikrovesikel-Behandlung leicht erhöht (Abb.28A).

Innerhalb der Gruppe der T-Lymphozyten wurden CD4⁺ von CD8a⁺ T-Zellen unterschieden, es konnten jedoch in beiden Gruppen keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden (Abb.28B+C).

Der Gesamt-Anteil CD11c positiver dendritischer Zellen an der Elterngeneration P1 stieg nach Mikrovesikel-Injektion nur in der Kontrollgruppe, nicht aber in der Atherosklerose-Gruppe leicht an (Abb.28D). Bei genauerer Betrachtung der Subtypen wird klar, dass dieser Anstieg sowohl auf eine leichte Erhöhung der plasmazytoiden dendritischen Zellen (CD11c⁺, B220⁺), als auch der klassischen dendritischen Zellen (B220⁻) zurückgeführt werden konnte (Abb.28E+F).

In einer Zellpopulation, die sowohl für Ly-6G als auch Ly-6C positiv war und bei der es sich um neutrophile Granulozyten handelte, konnte tendenziell ein Anstieg in ApoE^{-/-} Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen festgestellt werden (Abb.28G). Innerhalb der ApoE^{-/-} Tiere zeigte sich eine Reduktion nach Injektion von vor allem KLF2-Mikrovesikeln, die allerdings nicht signifikant war (Abb.28G).

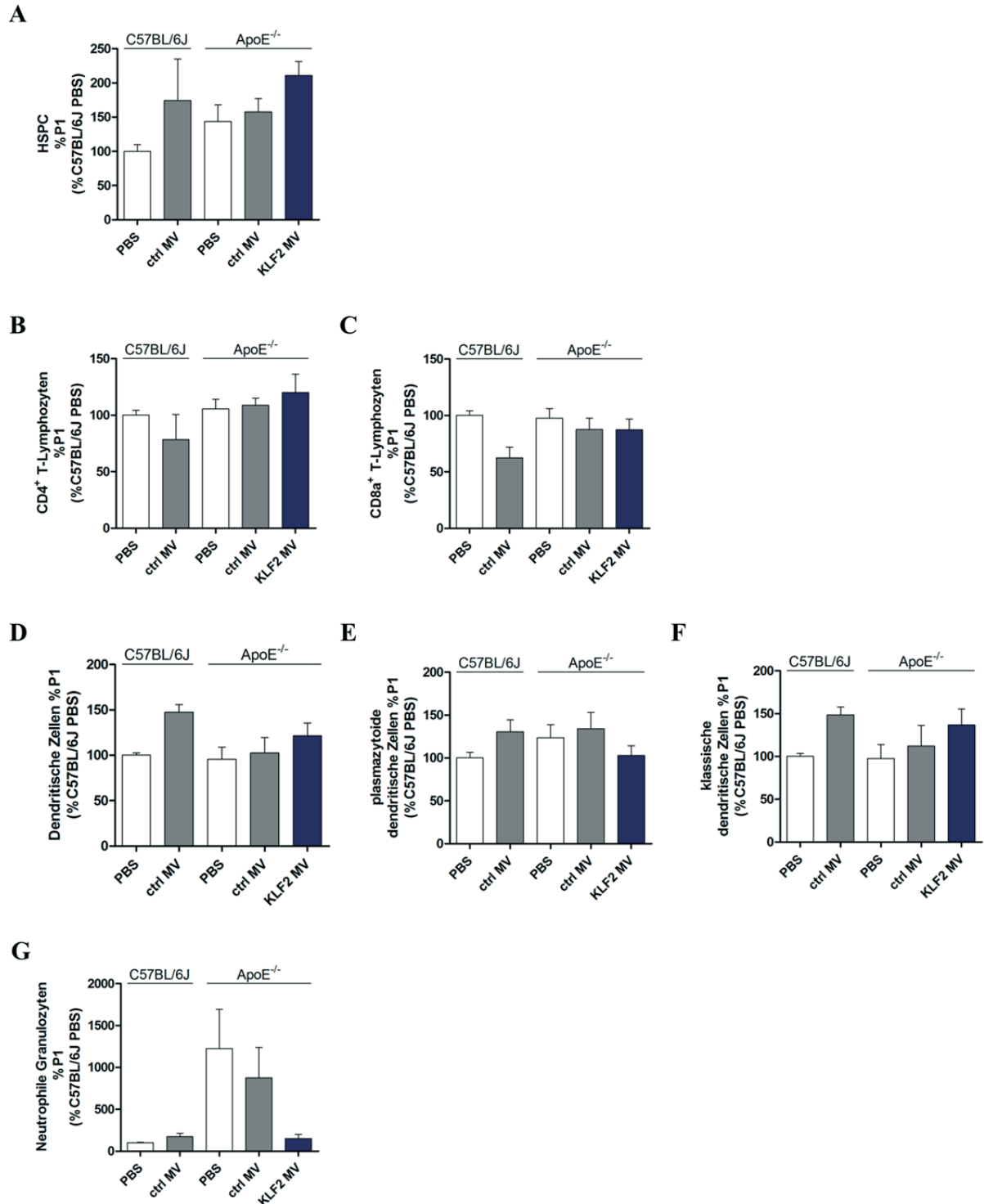


Abb. 28: Durchflusszytometrische Quantifizierung von HSPCs, T-Lymphozyten, Dendritischen Zellen und Neutrophilen Granulozyten innerhalb der mononukleären Zellen der Milz von C57BL/6J und ApoE^{-/-} Mäusen.

Splenozyten der verschiedenen Mausarten wurden über einen Dichtegradienten aufgereinigt und anschließend mit den für die verschiedenen Zellarten typischen Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht. Zeitpunkt: Nach 2 Wochen stark fetthaltiger Diät (ApoE^{-/-} Mäuse) innerhalb derer jeweils 1 Mal MV injiziert wurden. MV stammten von untransduzierten oder

KLF2-transduzierten und cel-miR-39-transfizierten mECs. Organentnahme erfolgte 24 h nach der zweiten MV-Injektion. **(A)** Lin⁻, Sca-1⁺, c-Kit⁺ HSPCs. **(B)** CD4⁺, CD8a⁻ T-Lymphozyten, **(C)** CD4⁺, CD8a⁺ T-Lymphozyten. **(D)** CD11c⁺ Dendritische Zellen, **(E)** CD11c⁺, B220⁺ Plasmazytoide Dendritische Zellen, **(F)** CD11c⁺, B220⁻ Klassische Dendritische Zellen. **(G)** CD11b⁺, Ly-6G⁺, Ly-6C⁺ Neutrophile Granulozyten.

C57BL/6J: PBS n=8, ctrl-MV n=3, **ApoE^{-/-}:** PBS n=8, ctrl-MV n=8, KLF2-MV n=6. Dargestellt als prozentualer Anteil der Kontroll-Kondition (PBS) der C57BL/6J Mäuse. Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben.

Der Level an Monozyten (CD11b⁺, F4/80⁻), die in der Milz gespeichert werden und bei Bedarf sehr schnell daraus mobilisiert werden können, war in den ApoE^{-/-} Mäusen leicht höher als in den Kontrollmäusen (Abb.29A). Abgesehen von diesem Trend lagen keine Unterschiede zwischen den Konditionen vor, so zeigte auch der jeweilige Anteil der pro- (Ly-6C^{high}) und anti-inflammatorischen (Ly-6C^{low}) Monozyten an der Gesamtheit der Monozyten und Granulozyten (CD11b⁺, F4/80⁻) keine signifikanten Unterschiede (Abb.29B+C).

In Bezug auf die Makrophagen (CD11b⁺, F4/80⁺) lag in den ApoE^{-/-} Mäusen eine leichte Reduktion nach KLF2-Mikrovesikel-Injektion vor (Abb.29F), was bei genauem Blick auf die zwei untersuchten Makrophagen-Populationen M1 (pro-inflammatorisch, CD206⁺) und M2 (anti-inflammatorisch, CD206⁻) eher auf eine Verminderung der M1-Makrophagen zurückzuführen war (Abb.29G+H). Der Anteil der M1- und M2-Makrophagen an der Gesamtheit aller Makrophagen wurde durch die unterschiedlichen Behandlungen nicht beeinflusst (Abb.29I+J). Im direkten Verhältnis von M1- zu M2-Makrophagen in ApoE^{-/-} Mäusen wurde nach Injektion von KLF2-Mikrovesikeln allenfalls ein leichter Abfall der M1-Makrophagen im Vergleich zu M2-Makrophagen sichtbar (Abb.29K).

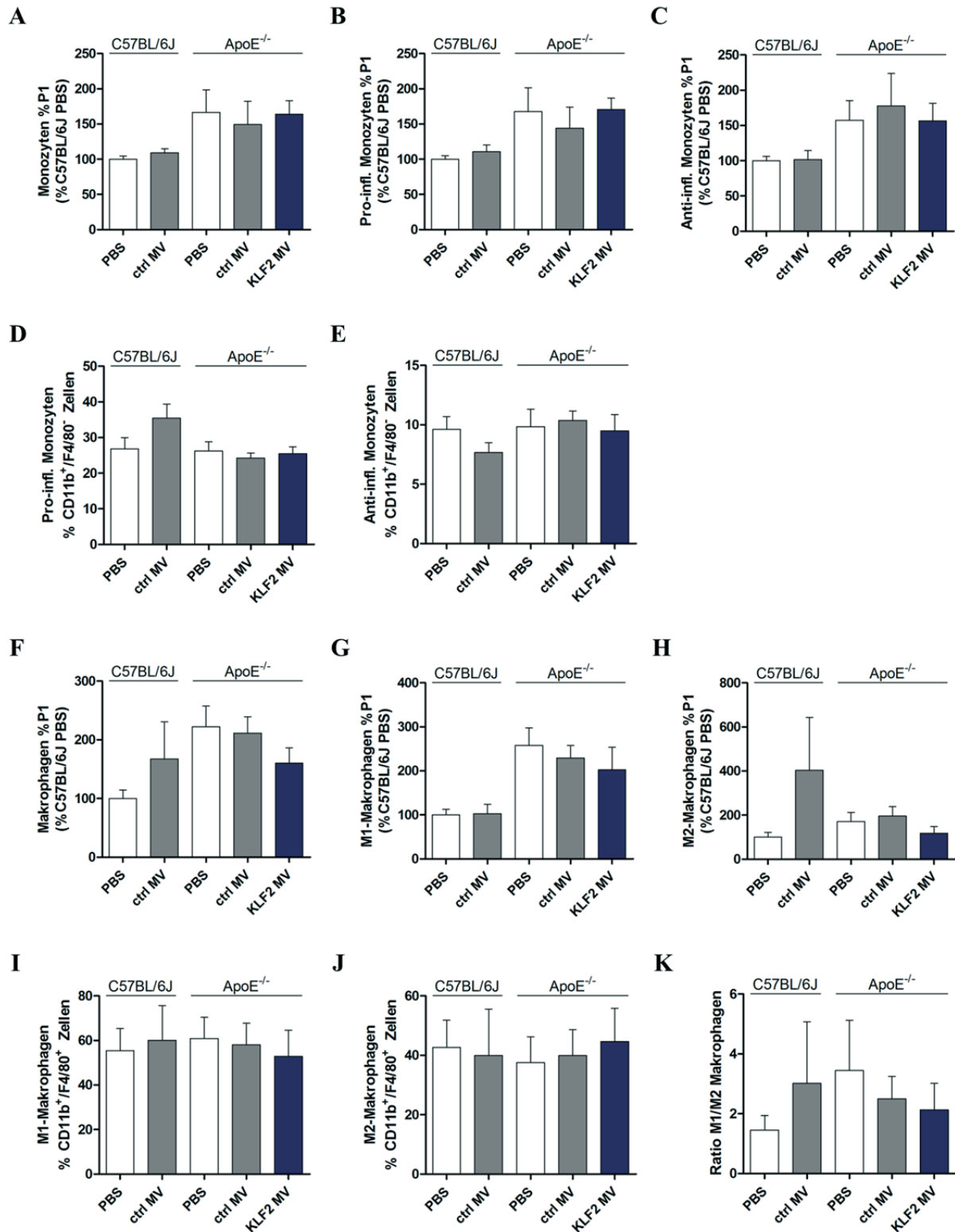


Abb. 29: Durchflusszytometrische Quantifizierung von Monozyten und Makrophagen innerhalb der mononukleären Zellen der Milz von C57BL/6J und ApoE^{-/-} Mäusen.

Splenozyten der verschiedenen Mausarten wurden über einen Dichtegradienten aufgereinigt, anschließend mit den für die verschiedenen Zellarten typischen Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht. Zeitpunkt: Nach 2 Wochen stark fetthaltiger Diät (ApoE^{-/-} Mäuse) innerhalb derer jeweils 1 Mal MV injiziert wurden. MV stammten von untransduzierten oder

KLF2-transduzierten und cel-miR-39-transfizierten mECs. Organentnahme erfolgte 24 h nach der zweiten MV-Injektion. **(A)** CD11b⁺, F4/80⁻, Ly-6C⁺ Monozyten. **(B)** CD11b⁺, F4/80⁻, Ly-6C^{high} Pro-inflammatorische Monozyten, **(C)** CD11b⁺, F4/80⁻, Ly-6C^{low/med} Anti-inflammatorische Monozyten. **(D, E)** Monozyten zusätzlich dargestellt als Prozentanteil aller CD11b⁺, F4/80⁻ Zellen. **(F)** CD11b⁺, F4/80⁺ Makrophagen, **(G)** CD11b⁺, F4/80⁺ CD206⁺ M1-Makrophagen, **(H)** CD11b⁺, F4/80⁺ CD206⁻ M2-Makrophagen. **(I, J)** Makrophagen zusätzlich dargestellt als Prozentanteil aller CD11b⁺, F4/80⁺ Zellen. **(K)** M1-Makrophagen dargestellt im Verhältnis zu M2-Makrophagen.

C57BL/6J: PBS n=8, ctrl-MV n=3 (Monozyten n=2), **ApoE^{-/-}:** PBS n=8, ctrl-MV n=8, KLF2-MV n=6. Dargestellt als prozentualer Anteil der Kontroll-Kondition (PBS) der C57BL/6J Mäuse. Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Injektion von mit cel-miR-39 beladenen Mikrovesikeln gering ausgeprägte biologische Effekte auf verschiedene Zellarten innerhalb der inflammatorisch aktivierten Milz hatte. Jeweils als leichter Trend zu erkennen war dabei ein reduzierter Level an pro-inflammatorischen M1-Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Abb.28G+29F-K) und gleichzeitig ein gesteigerter Anteil klassischer dendritischer Zellen an der Elterngeneration P1 nach Injektion von KLF2-Mikrovesikeln (Abb.28D-F).

Von Interesse war zusätzlich, ob mit Hilfe einer histologischen Untersuchung der Milzen in einer der Konditionen eine Veränderung der Zusammensetzung der verschiedenen Kompartimente der Milz erkennbar wäre. Daher wurden histologische Gewebeschnitte dieser Organe angefertigt und per Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt. Es konnten allerdings keine Unterschiede zwischen den einzelnen Konditionen festgestellt werden, weshalb Schnitt und Färbung hier nur beispielhaft dargestellt werden (Abb.30).

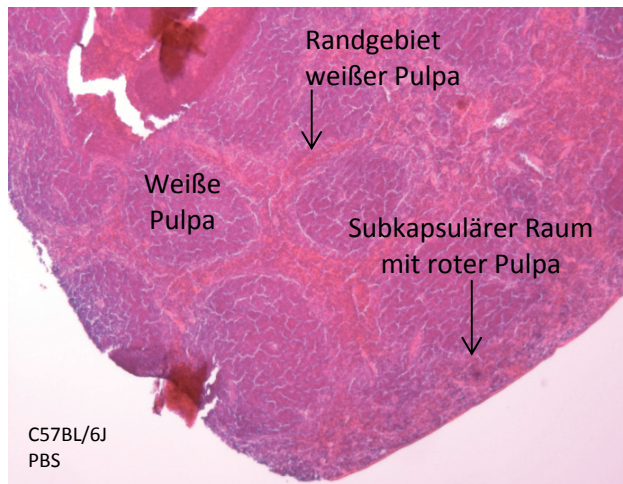


Abb. 30: Histologischer Schnitt durch die Milz einer C57BL/6J Kontrollmaus, gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin, 10x.

Da in dieser Arbeit bereits demonstriert werden konnte, dass Mikrovesikel dazu fähig sind miRs von einer Zellart zur Anderen zu transferieren kam die Frage auf, ob die leichten Veränderungen in der Zusammensetzung der Splenozyten in Zusammenhang mit bestimmten, in Endothelzell-Vesikeln angereicherten, microRNAs stehen könnten. Um dies zu beantworten, wurden die Level von ausgewählten miRs in den Milzen der unterschiedlichen Gruppen per real-time PCR gemessen. Die Wahl fiel dabei auf miR-145, miR-150, miR-126 und miR-27b. Allerdings veränderten sich diese miR-Level innerhalb der Milzen nach Injektion der unterschiedlichen Vesikel nicht (Abb.31).

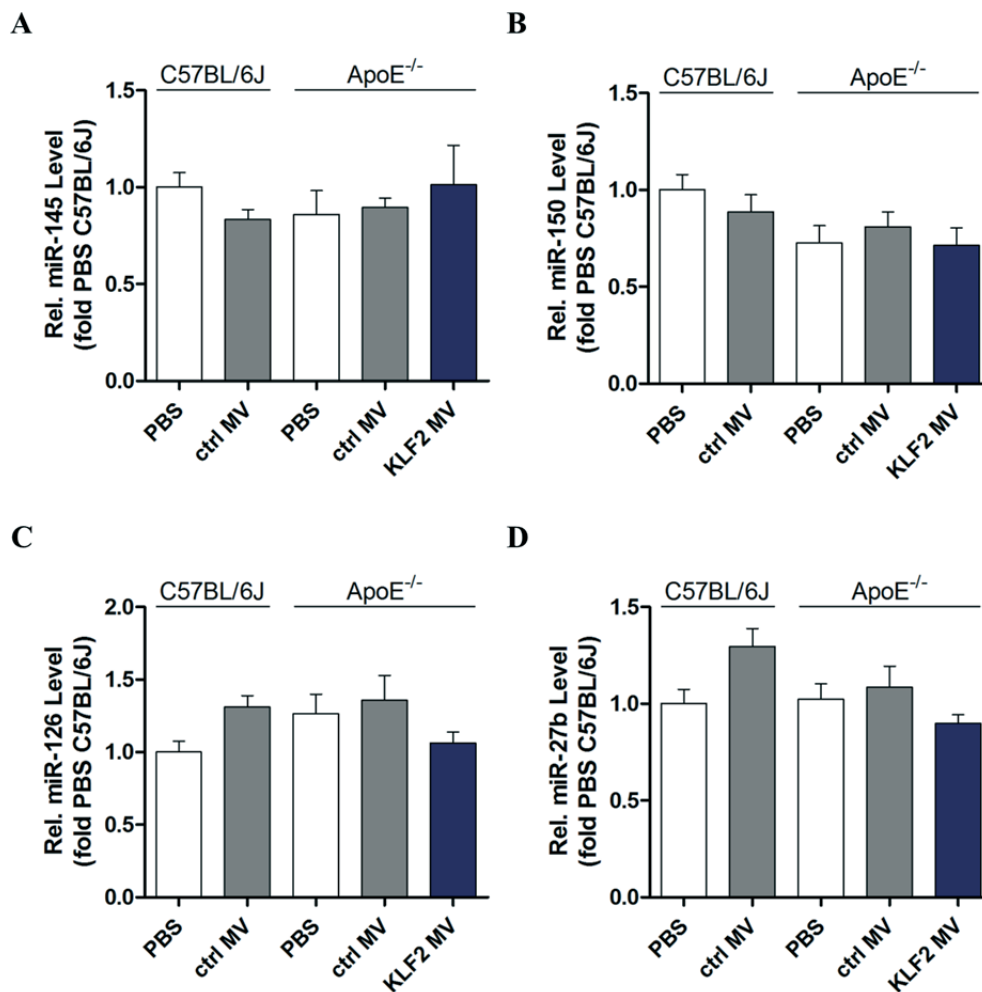


Abb. 31: MiR-145, -150, -126, -27b werden nicht durch Mikrovesikel von normalen und KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen in der Milz angereichert.

Messung in Milzen nach 2 Wochen stark fetthaltiger Diät (ApoE^{-/-} Mäuse) innerhalb derer jeweils 1 Mal MV injiziert wurden. MV stammten von untransduzierten oder KLF2-transduzierten und cel-miR-39-transfizierten mECs. Organentnahme erfolgte 24 h nach der zweiten MV-Injektion; n=3-9. **(A)** Relative miR-145 Expression, **(B)** relative miR-150 Expression, **(C)** relative miR-126 Expression, **(D)** relative miR-27b Expression. Alle Daten dargestellt im Verhältnis zur Kontroll-Kondition (PBS) der C57BL/6J Mäuse. Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben.

3.4 Inkubation von Makrophagen mit Mikrovesikeln von mock/KLF2-transduzierten Endothelzellen führt *in vitro* zu einer Erhöhung der M1-Marker und der Zellzahl

Wie im vorigen *in vivo*-Versuch (3.3.3.1) gezeigt werden konnte, sind vor allem Mikrovesikel von KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen in der Lage, die An-

zahl der M1-Makrophagen in der Milz von ApoE^{-/-} Mäusen leicht zu senken (Abb.29F-K). Daraus abgeleitet sollte auf die Frage eingegangen werden, ob es sich hierbei um einen unspezifischen Effekt der Mikrovesikel per se oder einen spezifischen Effekt der transportierten miR auf Makrophagen handelt.

Im darauffolgenden *in vitro*-Versuch sollte daher gezeigt werden, ob die von mock- bzw. KLF2-transduzierten Endothelzellen stammenden Mikrovesikel unter basalen als auch aktivierten Bedingungen die Differenzierung und/oder Anzahl der Makrophagen beeinflussen können. In diesem Fall wurden die Vesikel nicht mit der cel-miR beladen, um jegliche dadurch hervorgerufene Nebeneffekte auszuschließen. Innerhalb der Makrophagen gibt es zwei Subtypen, pro- und anti-inflammatorische Makrophagen, die sich durch ihr Aktivierungs-, Expressions- und Sekretionsprofil unterscheiden^{29,35,86}. Diese werden als M1- (pro-inflammatorisch) und M2-Makrophagen (anti-inflammatorisch) bezeichnet und sezernieren entsprechende Zytokine. Die M2-Makrophagen können weiter in M2a-, M2b- und M2c-Subtypen unterteilt werden, die sich ebenfalls in ihrem Polarisierungsstimulus und in ihrem Zytokin-Sekretionsprofil unterscheiden³⁵. Man spricht bei den M1-Makrophagen auch von „klassisch aktivierten“, bei den M2-Makrophagen von „alternativ aktivierten“ Makrophagen⁸⁷.

Die für diesen Versuch verwendeten Makrophagen wurden zunächst durch Spülungen der Bauchhöhle (*Cavitas abdominalis*) von C57BL/6J Mäusen mit PBS isoliert. Anschließend konnten diese peritonealen Makrophagen *in vitro* für 36 h mit Mikrovesikeln inkubiert werden. Nachfolgend wurden die Zellen dann für 24 h mit verschiedenen Faktoren aktiviert und damit in den M1- oder M2-Subtyp differenziert. Hierbei führte die 24-stündige Behandlung der Makrophagen mit Lipopolysaccharid (LPS, 100 ng/ml Medium) + Interferon- γ (IFN- γ , 20 ng/ml Medium) zur Differenzierung von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen wohingegen die Inkubation mit Interleukin-4 (IL-4, 200 ng/ml Medium) zu anti-inflammatorischen M2-Makrophagen führte. Je nach Stimulus können Makrophagen auch reversibel zum jeweils anderen Zelltyp differenzieren.

Kurz vor Beenden des Versuches wurden mikroskopische Aufnahmen der Zellen unter den jeweiligen Inkubationsbedingungen angefertigt, da nach Behandlung mit Mikro-

vesikeln prinzipiell mehr Zellen zu beobachten waren. Nachdem der Versuch anschließend gestoppt und die RNA der Makrophagen isoliert wurde, wurde der Gehalt von verschiedenen M1- und M2-Markern auf mRNA-Ebene mittels real-time PCR gemessen. Als M1-Marker dienten hierbei Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), wohingegen Fizz-1 und Arginase-1 (Arg-1) als M2-Marker verwendet wurden^{29,35,88,89}.

Innerhalb der nicht aktivierten Makrophagen (ctrl) fanden sich nach Behandlung mit mock- als auch KLF2-Vesikeln im Vergleich zur Kontrolle (PBS) erhöhte M1-Marker-Level und eine Reduktion des M2-Markers Fizz-1 in den Makrophagen (Abb.32A,B,C). Nach erfolgreicher Differenzierung in Richtung M1 oder M2 durch LPS/IFN- γ oder IL-4 (Abb.32A,B,C) konnte in einem der M1-Marker (IL-1 β) der Anstieg durch mock- und KLF2-Mikrovesikel-Behandlung bestätigt werden, der ebenfalls bei den IL-4-vorbehandelten Zellen gemessen wurde (Abb.32A). Durch den zweiten M1-Marker, TNF- α , konnte dieser Trend außer in der Kontrollkondition nicht bestätigt werden (Abb.32B). Der M2-Marker Fizz-1 zeigte basal, sowie nach Aktivierung eine zum Teil signifikante Reduktion der Expression nach mock- und KLF2-Mikrovesikel-Inkubation (Abb.32C). Die Arginase-1-Level nach LPS/IFN- γ -Vorbehandlung unterschieden sich nicht von denen, die nach Aktivierung durch IL-4 gemessen wurden (Abb.32D).

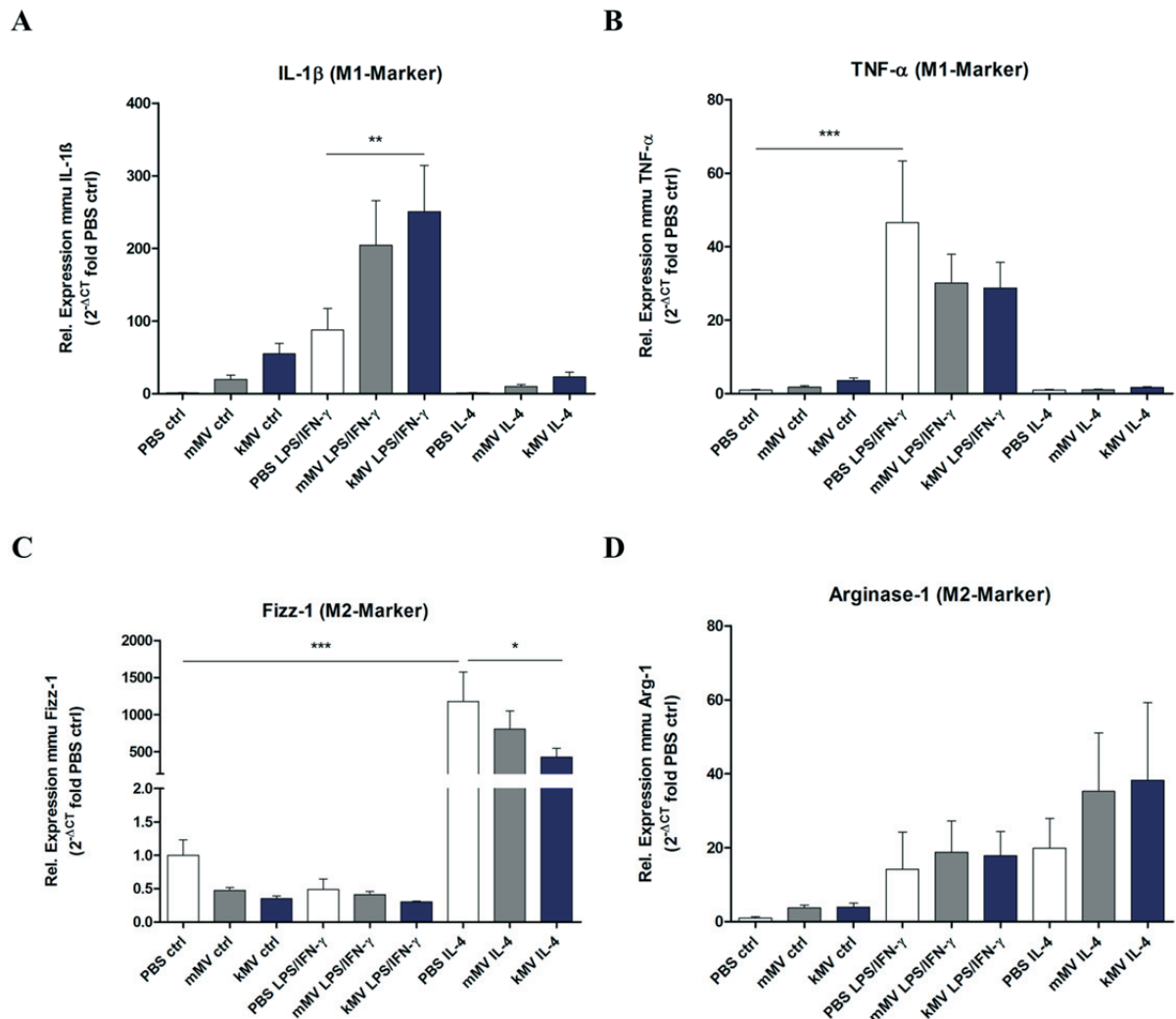


Abb. 32: Die Inkubation der Makrophagen mit Mikrovesikeln von mock- oder KLF2-transduzierten Endothelzellen bewirkt unter basalen und aktivierten Bedingungen eine Erhöhung des M1-Markers IL-1 β .

Makrophagen wurden durch peritoneale Lavage aus der Bauchhöhle von C57BL/6J Mäusen isoliert, in Kultur genommen und für 36 h mit MV von mock- oder KLF2-transduzierten mECs inkubiert, PBS diente als Kontrolle. Anschließend Zugabe von LPS+IFN- γ bzw. IL-4, um Differenzierung zu M1- bzw. M2-Makrophagen anzuregen, PBS als Kontrolle (ctrl). **PBS ctrl:** 36 h Inkubation mit PBS, dann 24 h Inkubation mit PBS; **mMV ctrl:** 36 h Inkubation mit mock MV, dann 24 h Inkubation mit PBS; **kMV ctrl:** 36 h Inkubation mit KLF2 MV, dann 24 h Inkubation mit PBS; **PBS LPS/IFN- γ :** 36 h Inkubation mit PBS, dann 24 h Inkubation mit LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (20 ng/ml); **mMV LPS/IFN- γ :** 36 h Inkubation mit mock MV, dann 24 h Inkubation mit LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (20 ng/ml); **kMV LPS/IFN- γ :** 36 h Inkubation mit KLF2 MV, dann 24 h Inkubation mit LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (20 ng/ml); **PBS IL-4:** 36 h Inkubation mit PBS, dann 24 h Inkubation mit IL-4 (200 ng/ml); **mMV IL-4:** 36 h Inkubation mit mock MV, dann 24 h Inkubation mit IL-4 (200 ng/ml); **kMV IL-4:** 36 h Inkubation mit KLF2 MV, dann 24 h Inkubation mit IL-4 (200 ng/ml); **(A)** Relative

Expression von murinem IL-1 β . **(B)** Relative Expression von murinem TNF- α . **(C)** Relative Expression von murinem Fizz-1. **(D)** Relative Expression von muriner Arg-1. n=5.
Alle Daten dargestellt im Verhältnis zur unbehandelten Kontroll-Kondition (PBS ctrl). Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Die mikroskopischen Aufnahmen der Makrophagen, von denen eine Reihe beispielhaft in Abbildung 33 abgebildet ist, führten zum visuellen Eindruck, dass in den mit Mikrovesikeln behandelten Konditionen zahlenmäßig mehr Zellen vorhanden waren. Um diesen Eindruck zu bestätigen wurde bei dem darauffolgenden Versuchsansatz mit n=2 eine Quantifizierung der Zellen durchgeführt. Dadurch konnte der visuelle Eindruck belegt werden. Basal sowohl als auch nach der Aktivierung der Zellen durch LPS/IFN- γ und IL-4 stieg im Trend die Anzahl der Zellen nach Mikrovesikel-Behandlung (Abb.34), auch wenn bei der geringen Anzahl an Experimenten eine statistische Auswertung nicht möglich war.

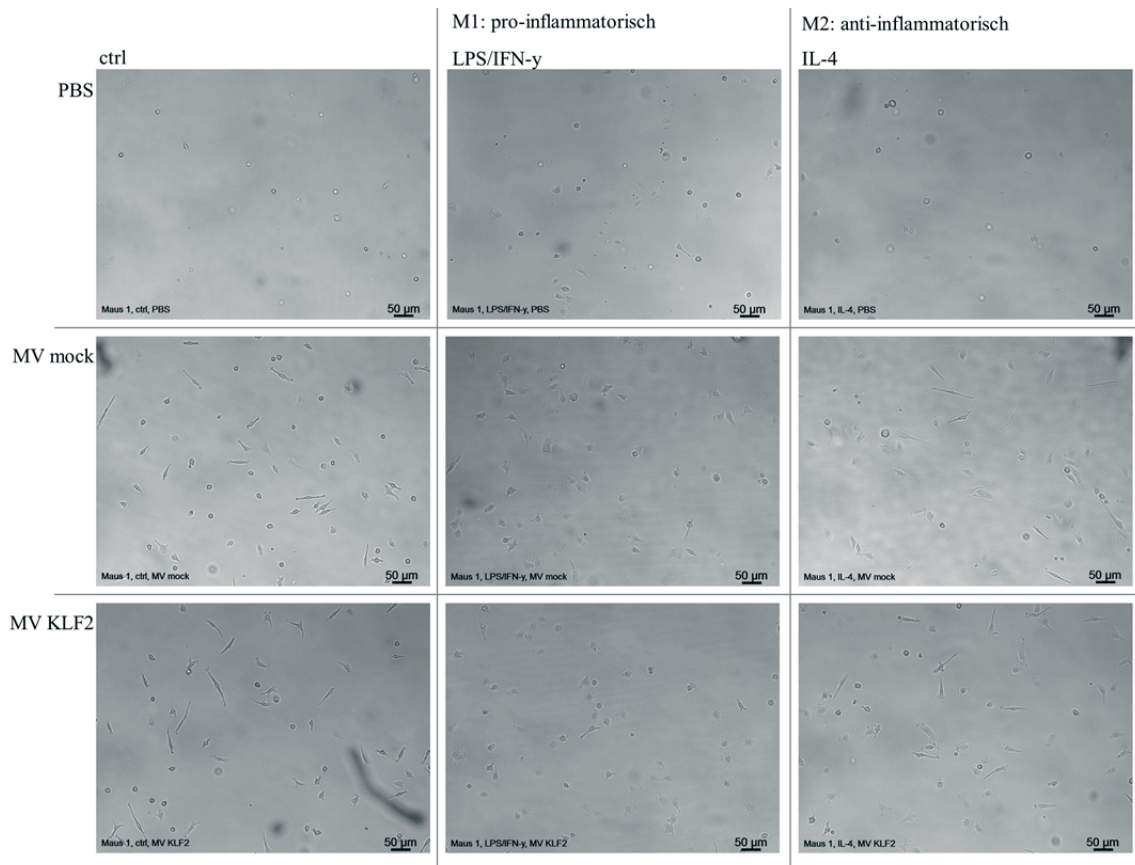


Abb. 33: Beispiel für mikroskopische Aufnahmen der Makrophagen, 36 h nach Mikrovesikel-Inkubation und 24 h nach Aktivierung.

Makrophagen wurden durch peritoneale Lavage aus der Bauchhöhle von C57BL/6J Mäusen isoliert, in Kultur genommen und für 36 h mit MV von mock- oder KLF2-transduzierten mECs inkubiert. Anschließend Zugabe von LPS+IFN- γ bzw. IL-4, um Differenzierung zu M1- bzw. M2-Makrophagen anzuregen, dabei Zugabe von PBS als Kontrolle. n=3

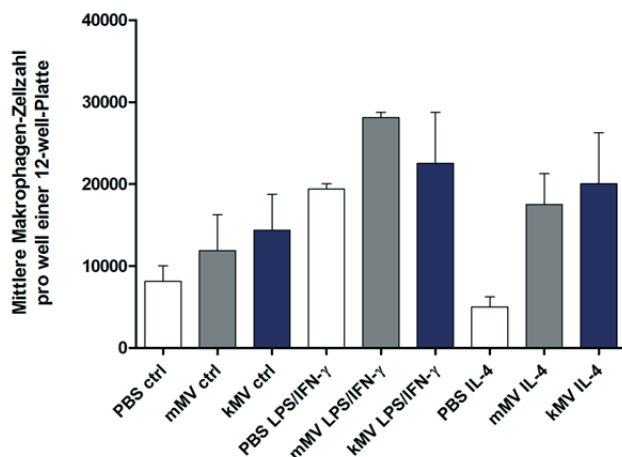


Abb. 34: Die Inkubation der peritonealen Makrophagen mit Mikrovesikeln von mock- und KLF2-transduzierten Endothelzellen führt unter basalen und aktivierten Bedingungen tendenziell zu einer Erhöhung der Zellzahl.

Mittlere Anzahl an Makrophagen innerhalb eines *well*s einer 12-*well*-Zuflkulturplatte. Makrophagen aus der Bauchhöhle von C57BL/6J Mäusen isoliert, in Kultur genommen und anschließend für 36 h mit MV von mock- oder KLF2-transduzierten mECs inkubiert. Anschließend Zugabe von LPS+IFN- γ bzw. IL-4, um Differenzierung zu M1- bzw. M2-Makrophagen anzuregen, Zugabe von PBS als Kontrolle. **PBS ctrl:** 36 h Inkubation mit PBS, dann 24 h Inkubation mit PBS; **mMV ctrl:** 36 h Inkubation mit mock MV, dann 24 h Inkubation mit PBS; **kMV ctrl:** 36 h Inkubation mit KLF2 MV, dann 24 h Inkubation mit PBS; **PBS LPS/IFN- γ :** 36 h Inkubation mit PBS, dann 24 h Inkubation mit LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (20 ng/ml); **mMV LPS/IFN- γ :** 36 h Inkubation mit mock MV, dann 24 h Inkubation mit LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (20 ng/ml); **kMV LPS/IFN- γ :** 36 h Inkubation mit KLF2 MV, dann 24 h Inkubation mit LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (20 ng/ml); **PBS IL-4:** 36 h Inkubation mit PBS, dann 24 h Inkubation mit IL-4 (200 ng/ml); **mMV IL-4:** 36 h Inkubation mit mock MV, dann 24 h Inkubation mit IL-4 (200 ng/ml); **kMV IL-4:** 36 h Inkubation mit KLF2 MV, dann 24 h Inkubation mit IL-4 (200 ng/ml). n=2.

Aus den vorliegenden Ergebnissen ist zu schließen, dass *in vitro* die Inkubation der Makrophagen mit Mikrovesikeln von Endothelzellen die Differenzierung zu M1-Makrophagen unter basalen Bedingungen förderte. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem *in vivo*-Versuch, bei dem die Anzahl der M1-Makrophagen in der Milz nach Mikrovesikel-Injektion eher abnahm. Weiterhin deutet dieser Versuch auf die Möglichkeit hin, dass die Vesikel auf Makrophagen aller Konditionen einen proliferativen Effekt haben. Dieses Phänomen müsste in weiteren Versuchen genauer untersucht und bestätigt werden.

4 Diskussion

4.1 Mikrovesikel von transduzierten & transfizierten Endothelzellen transportieren miR in Zellen des kardiovaskulären Systems

Endothelzellen sind, wie viele andere Zellarten, in der Lage, Mikrovesikel zu produzieren und über diese diverse Signale, wie beispielsweise microRNAs, an die entsprechenden Empfängerzellen zu transferieren^{67,75,79}. Nicht bekannt ist dabei bisher, ob es sich um einen spezifisch gerichteten Transfer handelt, sodass verschiedene Empfängerzellarten quantitative Unterschiede in der Aufnahme der Vesikel und deren Inhalts zeigen.

Diese Frage sollte durch den folgenden *in vitro*-Versuch beantwortet werden. Endothelzellen (HUVECs), von denen bekannt ist, dass auf sie wirkende Strömungsverhältnisse und damit die Stärke der Schubspannung einen entscheidenden Einfluss auf ihren Phänotyp haben⁶, dienten dabei als Spenderzellart für die Mikrovesikel. Der atheroprotektive Phänotyp, der bei laminarer Strömung mit hoher Schubspannung entsteht, wird vor allem durch den Transkriptionsfaktor KLF2 vermittelt^{80–82}. Weiterhin wurde belegt, dass ein erhöhter KLF2-Level der Endothelzellen die Zusammensetzung des Vesikel-Inhalts modifizieren kann⁷⁵. Um der Situation *in vivo* möglichst nahe zu kommen, wurden die Spenderzellen zunächst lentiviral mit humanem KLF2 (bzw. mock) transduziert, um damit zusätzlich die Frage beantworten zu können, welche Rolle dieser Transkriptionsfaktor bei der interzellulären Kommunikation zwischen Endothelzellen und verschiedenen Empfängerzellarten spielt. Die erfolgreiche Transduktion führte dabei zu einer 11,2-fachen Überexpression von KLF2 im Vergleich zu mock (Abb.15A).

Um Unterschiede im Transfer von miRs von Endothelzellen zu diversen Empfängerzellarten quantitativ aufzeigen zu können, musste auszuschließen sein, dass diese miR von den Empfängerzellen selbst exprimiert wird. Nur so konnte sichergestellt werden, dass die in den Empfängerzellen detektierte miR-Menge ursprünglich durch die Mikrovesikel der Spenderzellen transferiert wurde. Die Endothelzellen wurden daher mit einer für den Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) spezifischen miR

transfiziert (cel-miR-39). Nach 72 h wurde der cel-miR-39-Gehalt in den Spenderzellen gemessen und es fiel auf, dass die KLF2-transduzierten Endothelzellen, im Vergleich zur Kontrolle, einen signifikant höheren Level aufwiesen (Abb.15B+C). Dieser Unterschied macht deutlich, dass KLF2 in Endothelzellen entweder einen Einfluss auf die Effektivität der Transfektion oder den Abbau der cel-miR innerhalb der Zelle nimmt. Es konnte belegt werden, dass Endothelzellen durch erhöhte KLF2-Level in einen inaktiveren Zustand versetzt werden⁹⁰. Es ist also durchaus möglich, dass in KLF2-transduzierten HUVECs weniger Abbau der cel-miR-39 stattfindet und es dadurch zu dem ca. 6-fach erhöhten miR-Level kommt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es einen Unterschied im Export, also der Ausschleusung der cel-miR-39 aus Endothelzellen in Mikrovesikel gibt. In der Berechnung des Exports als Quotient aus cel-miR-Gehalt innerhalb der Spenderzellen und innerhalb der von ihnen produzierten Mikrovesikel war jedoch kein Unterschied zwischen den mock- und KLF2-transduzierten Endothelzellen zu erkennen (Abb.17).

Die Mikrovesikel von den wie eben beschrieben transduzierten Endothelzellen wiesen einen ähnlichen und ebenfalls signifikanten Unterschied im cel-miR-39-Level auf (Abb.15E), was die logische Konsequenz aus dem bereits in den Spenderzellen erhöhten Level ist.

Die verschiedenen Empfängerzellarten wurden 24 h mit den miR-beladenen Mikrovesikeln inkubiert. Bei einem akuten Myokardinfarkt sind unter anderem Endothelzellen, vaskuläre glatte Muskelzellen, Kardiomyozyten und Immunzellen involviert, weshalb diese Zellarten als Empfängerzellen dienen. Als Immunzellen wurden Monozyten untersucht, deren Differenzierung zu Makrophagen über 7 Tage durch verschiedene Wachstumsfaktoren (GM-CSF, M-CSF) stimuliert wurde. Diese Wachstumsfaktoren regten dabei gleichzeitig die Polarisierung der Zellen in Richtung M1- oder M2-Makrophagen an⁷⁸.

Die Gruppe der Gewebezellen (HUVECs, SMCs, HCMs) und die der Immunzellen (unbehandelte Monozyten, M1-, M2-Makrophagen und gemischte Population) werden in den Ergebnissen getrennt voneinander betrachtet, da es sich um zwei unabhängige Experimente handelte.

Wie die Ergebnisse zeigen, sind endotheliale mock- und KLF2-Mikrovesikel in der Lage, die in ihnen verpackte cel-miR in großem Maße in alle hier getesteten Empfängerzellarten zu transferieren (Abb.16A+B), wobei die Mikrovesikel von KLF2-transduzierten Endothelzellen in jede Zellart die 6-13-fache miR-Menge transferierten als die Kontroll-Vesikel (Abb.16C+D). Dies wirft die Frage auf, weshalb diese mindestens 6-fach erhöhten relativen Level an cel-miR-39 nach KLF2-Mikrovesikel-Inkubation in allen Empfängerzellarten bestehen. Für diesen Unterschied zwischen mock- und KLF2-Mikrovesikeln gibt es prinzipiell 3 mögliche Ursachen: Unterschied im Export der miR in die Vesikel (es wird mehr cel-miR-39 pro KLF2-Mikrovesikel verpackt, als pro mock-Mikrovesikel), in der Aufnahme der Vesikel durch die Empfängerzellen (KLF2-Vesikel werden besser von Empfängerzellen aufgenommen) oder in der Anzahl der von den Spenderzellen produzierten Vesikel (KLF2-transduzierte Spenderzellen produzieren zahlenmäßig mehr Mikrovesikel).

Bei diesen Versuchen lag kein Unterschied im Export vor (Abb.17) und auch die Aufnahmerate zumindest der Gewebezellen zeigte keinen Unterschied (Abb.18A). Natürlich besteht die Möglichkeit, dass KLF2-transduzierte Endothelzellen im Vergleich zu mock-Transduzierten zahlenmäßig mehr Mikrovesikel produzieren. Spekuliert man aber, dass jede Zelle nur eine begrenzte Anzahl an Mikrovesikeln aufzunehmen bereit ist und mehr Mikrovesikel ins Medium gegeben wurden als nötig, so würde dies dafür sprechen, dass die Anzahl der Mikrovesikel hier eine untergeordnete Rolle spielte. Um diese Hypothese zu belegen könnte ein Experiment durchgeführt werden, bei dem über eine Mikrovesikel-Konzentrationsreihe mit anschließender Messung der übertragenen cel-miR-39-Level festgestellt werden würde ab welcher Mikrovesikel-Menge das System gesättigt wäre.

Zusätzlich zu den 3 erwähnten Möglichkeiten sind die unterschiedlichen cel-miR-39-Level nach mock- oder KLF2-Mikrovesikel-Inkubation bei diesem Versuch eine logische Konsequenz aus dem bereits in den KLF2-Vesikeln erhöhten miR-Level (Abb.15E). Der errechnete Export (als Verhältnis von hinzugefügter miR-Menge zu miR-Menge in den Empfängerzellen) der miR aus den Endothelzellen in die Mikrovesikel unterscheidet sich somit zwar nicht, weil aber initial mehr miR in

den Spenderzellen vorhanden war, konnte natürlich auch insgesamt mehr exportiert werden.

Kardiomyozyten zeigten, gefolgt von vaskulären glatten Muskelzellen, nach Inkubation mit mock- als auch KLF2-Mikrovesikeln den höchsten Level an cel-miR-39 (Abb.16A+E). Bei den Immunzellen waren in unbehandelten Monozyten, gefolgt von M1-Makrophagen die höchsten miR-Level zu sehen (Abb.16B+E). Aus diesen Unterschieden kann zunächst geschlossen werden, dass zellartspezifische Unterschiede in der Effektivität des Transfers bestehen. Worauf dieser zielgerichtete Transport zurückzuführen ist bleibt zunächst unklar. Es kann vermutet werden, dass endotheliale Mikrovesikel spezielle Oberflächenmoleküle tragen, die von bestimmten Rezeptoren auf den Empfängerzellen erkannt werden. Diese Hypothese würde vor dem Hintergrund der hier gezeigten Ergebnisse dafür sprechen, dass diejenigen Zellarten, welche die stärkste Aufnahme der Vesikel zeigten, die höchste Anzahl an passenden Oberflächenmolekülen tragen würden. Da allerdings bisher nicht genau bekannt ist auf welchen Wegen die hier verwendeten Mikrovesikel tatsächlich von den Zielzellen aufgenommen werden, können auch viele andere Mechanismen im gerichteten Transfer endothelialer Vesikel eine Rolle spielen.

Durch den Quotienten aus dem cel-miR-39-Gehalt in Empfängerzellen und Mikrovesikeln konnte die Aufnahme quantifiziert werden. Zu bedenken ist dabei natürlich, dass der Prozentsatz, der während der 24-stündigen Inkubation der Zellen mit den Vesikeln aufgenommen, aber von den Empfängerzellen innerhalb dieses Zeitraumes wieder abgebaut wurde, nicht berücksichtigt werden konnte. Nach 24-stündiger Inkubation mit den Mikrovesikeln, deren cel-miR-39-Gehalt als 100% galt, sind zwischen 0,04 und 2,14% davon in die Empfängerzellen transferiert worden. Dieser Anteil muss allerdings vorsichtig und kann vor allem nicht absolut beurteilt werden, denn wenn man einmal davon ausgeht, dass das System mit cel-miR-39-beladenen Vesikeln übersättigt gewesen wäre, konnte die begrenzte Anzahl der Zellen innerhalb der 24-stündigen Inkubation ggf. nicht viel mehr Mikrovesikel und damit cel-miR-39 aufnehmen. Wahrscheinlich wäre in diesem Fall, dass sich der von der Gesamtzellzahl aufgenommene miR-Anteil bei Steigerung der Zellzahl und Fläche und dennoch

gleichbleibender Mikrovesikel-Dosis noch bis zu einem gewissen Grad weiter erhöhen würde. Dabei handelt sich allerdings lediglich um eine Hypothese, die in einer, wie oben bereits vorgeschlagenen, Mikrovesikel-Konzentrationsreihe untersucht werden müsste, um diese Frage abschließend beantworten zu können.

Kardiomyozyten und vaskuläre glatte Muskelzellen zeigten, unabhängig von einer KLF2-Transduktion der Vesikel-Spenderzellen, eine höhere Aufnahmerate als Endothelzellen (Abb.18A). Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass Endothelzellen (hier Spenderzellart und gleichzeitig eine der Empfängerzellarten) durch die von ihnen produzierten Mikrovesikel eher mit Kardiomyozyten und vaskulären glatten Muskelzellen kommunizieren als mit anderen Endothelzellen desselben Ursprungs. Über 7 Tage unbehandelte Monozyten, sowie in Richtung M1-polarisierte Makrophagen zeigten höhere Aufnahmeraten als die anderen beiden Populationen (Abb.18B). Die endothelialen Mikrovesikel scheinen also eine höhere Affinität für Monozyten und M1-Makrophagen zu besitzen. Allerdings muss gesagt werden, dass Monozyten, die 7 Tage lang unbehandelt in Kultur gehalten wurden sicherlich nicht mehr in allen Aspekten den Anfangszellen gleichen. Zwar sind sie nicht klar zu Makrophagen differenziert, es handelt sich aber vermutlich auch nicht mehr um eine reine Monozyten-Population.

Interessant bei diesen Ergebnissen war, dass in Bezug auf die Aufnahmerate eine Verstärkung nach KLF2-Mikrovesikel-Inkubation im Vergleich zu mock-Vesikeln lediglich in den Immunzellen beobachtet werden konnte (Abb.18A+B). In Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten fiel dieser Effekt durch die Normalisierung auf den jeweiligen *Input* weg (Abb.18A).

Überträgt man diese Ergebnisse gedanklich in eine im Organismus tatsächlich vorliegende Situation, so lässt sich spekulieren, dass die von Endothelzellen in Bereichen laminarer Strömung produzierten und in die Blutbahn abgegebenen Mikrovesikel vor allem von den ebenfalls im Blut zirkulierenden Monozyten aufgenommen werden würden. Endothelzellen, die laminarer Strömung und daher erhöhter Schubspannung ausgesetzt sind, zeigen prinzipiell einen anti-inflammatorischen Phänotyp. Gegebenenfalls könnten sie also anti-inflammatorische Signale über ihre Mikrovesikel an die Monozyten senden.

4.2 Mikrovesikel von transduzierten & transfizierten Endothelzellen transferieren miR in Splenozyten

Die Milz spielt in der Entwicklung und dem Fortschreiten der Atherosklerose eine entscheidende Rolle³⁸. Daher sollte mit einem Vorversuch zum Atherosklerose-Modell die Frage beantwortet werden, ob der Transfer von cel-miR-39 über Mikrovesikel von Endothelzellen zu mononukleären Zellen der murinen Milz prinzipiell möglich ist und welche Rolle eine vorherige Transduktion der Spenderzellen mit KLF2 spielt.

Das Ergebnis konnte belegen, dass der Transfer von cel-miR-39 durch Mikrovesikel von murinen Endothelzellen zu Splenozyten von C57BL/6J Mäusen *in vitro* erfolgreich war. Dabei zeigten die KLF2-Mikrovesikel bei ähnlichem cel-miR-39-Level in mock- und KLF2-Vesikeln, eine signifikant höhere Transfereffektivität (Abb.19). Die KLF2-Überexpression der Vesikel-Spenderzellen *in vitro* soll die *in vivo*-Situation von Endothelzellen unter erhöhter Schubspannung, die durch laminare Strömung ausgelöst wurde, simulieren. Die Mikrovesikel von Endothelzellen, die laminarer Strömung ausgesetzt sind, könnten also beispielsweise durch die Struktur und Zusammensetzung ihrer Oberflächenmoleküle besser von mononukleären Zellen der Milz aufgenommen werden. Ob sich dies lediglich auf die Splenozyten bezieht oder generell für mononukleäre Zellen gilt bliebe zu erforschen. Weiterhin wäre es interessant herauszufinden, welche Informationen die von KLF2-transduzierten Endothelzellen stammenden Mikrovesikel an die mononukleären Zellen liefern und inwiefern sie diese Zielzellen damit beeinflussen könnten.

4.3 Mikrovesikel von transduzierten & transfizierten Endothelzellen transferieren miR *in vivo* lediglich in die Leber

Nachdem feststand, dass endotheliale Mikrovesikel *in vitro* in der Lage sind, in ihnen verpackte cel-miR-39 in unterschiedlichem Maße in die verschiedensten Empfängerzellen zu transportieren, stellte sich die Frage, ob dies auch *in vivo* möglich sei. Um dies zu beantworten, wurden gesunde C57BL/6J Mäuse 24 h vor der Tötung und Organentnahme mit PBS (Kontrolle) oder den von KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen stammenden, cel-miR-39-beladenen Mikrovesikeln injiziert.

Humanes KLF2 ist in den hier verwendeten murinen Endothelzellen nicht exprimiert. Daher lag nach Transduktion der murinen Endothelzellen mit humanem KLF2 ein ca. 200-fach erhöhter KLF2-Level im Vergleich zu untransduzierten Kontrollzellen vor (Abb.20A). Wie im Rahmen der Doktorarbeit überprüft wurde, führt die Transduktion der murinen Endothelzellen mit humanem KLF2 zu einer Reduktion von murinem KLF2 innerhalb der Zellen (Daten nicht gezeigt). Daher kann angenommen werden, dass das humane das murine KLF2 zu ersetzen vermag und es daher dieselbe Wirkung auf murine Endothelzellen hat. Bei den humanen endothelialen Spenderzellen in den vorangegangenen Experimenten lag nach Transfektion mit cel-miR-39 eine 6-fache Erhöhung dieser miR in den KLF2-transduzierten im Vergleich zu mock-transduzierten Endothelzellen vor (Abb.15C). Die murinen Endothelzellen wiesen an dieser Stelle lediglich eine 1,5-fache Erhöhung auf (Abb.20C). Auch wenn humanes KLF2 also den endogenen Level an murinem KLF2 senken kann, so scheinen die Effekte auf murine Endothelzellen weniger stark oder breit gefächert zu sein. Außerdem handelt es sich bei den zuvor verwendeten Endothelzellen um primäre Zellen (HUVECs), wohingegen die murinen Endothelzellen einer stabilen Zelllinie entstammten (mECH5V). Diese Zellen könnten sich daher in ihrer Reaktion auf z.B. Transduktion und Transfektion, sowie in Abbau und Verarbeitung überexprimierter miRs unterscheiden.

Die *in vivo* durchgeführten Vorversuche zum akuten Myokardinfarkt-Modell und zum Atherosklerose-Modell konnten demonstrieren, dass weder normale noch KLF2-Mikrovesikel in der Lage sind, cel-miR-39 in ausreichendem Maße in die Organe von gesunden C57BL/6J Mäusen zu transferieren (Abb.21+22). Zwar konnte in beiden Fällen die cel-miR-39 24 h nach Injektion der Vesikel im peripheren Blut detektiert werden, jedoch zeigte keines der untersuchten Organe eine Veränderung des cel-miR-39-Levels nach KLF2-Mikrovesikel-Injektion. Die Detektion im peripheren Blut könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Mikrovesikel noch nicht ausreichend in die Gewebe aufgenommen wurden, allerdings zeigten vergleichbare Versuche auch nach 48 h keinen weiteren Anstieg (Daten nicht gezeigt). Der nach KLF2-Mikrovesikel-Injektion leicht erhöhte cel-miR-39-Level in der Leber (Abb.21B)

verwundert nicht weiter, da es sich dabei um ein hochaktives Stoffwechselorgan handelt, das in der Lage ist, Stoffe aus dem Blut zu metabolisieren und zu entsorgen.

Auffallend waren die bei Darstellung der Ergebnisse als $2^{-\Delta CT}$ starken Schwankungen des cel-miR-39-Levels in den mit PBS injizierten Kontrolltieren (Abb.21A). Da cel-miR-39 weder in der Maus exprimiert wird noch im injizierten PBS enthalten sein sollte, müssten die gemessenen Werte bei 0,00 liegen. Die dennoch bestehenden Level und die Unterschiede zwischen den Organen deuten darauf hin, dass cel-miR-39 einen gewissen *Background* in den unterschiedlichen Proben hatte, der letztlich zu den Schwankungen führte. Dies gibt weiterhin Aufschluss darüber, dass die in allen Organen gemessenen miR-Level sich in der Nähe der „Wasserwerte“ befinden. Die Ergebnisse können daher im Gesamtkontext als niedrig eingeordnet werden.

Natürlich ist generell die Frage zu stellen, ob die Dosis der injizierten Vesikel und damit der cel-miR-39 ausreichend war. Dies kann nur in weiteren Versuchen beantwortet werden, wobei es sich mindestens um eine 10- bis 100-fache Erhöhung handeln müsste, um die Frage klar zu beantworten. Der technische Aufwand dafür überschreitet die aktuellen Möglichkeiten allerdings um ein Vielfaches. Auch die Erhöhung der Transfektionskonzentration wäre nicht von Nutzen, da die von den ECs produzierten Zellen nach einer 100nM Transfektion bereits mit cel-miR-39 gesättigt sind (Daten nicht gezeigt).

4.4 Transfer von endothelialen Mikrovesikeln im akuten Myokardinfarkt-Modell

4.4.1 Geringer Transport von miR aus transduzierten & transfizierten Endothelzellen in Zielgewebe trotz Aktivierung durch Myokardinfarkt

Da Mikrovesikel kaum in der Lage waren, cel-miR-39 in das Gewebe von gesunden Mäusen zu transferieren, wurden sie im nächsten Versuch in durch akuten Myokardinfarkt lokal und systemisch inflammatorisch aktivierte Mäuse injiziert. Vor allem im Grenzgebiet zwischen Infarkt und gesundem Myokard, der *Border-Zone*, kommt es zu

einer starken inflammatorischen Reaktion, die wiederum im Verlauf auch das restliche Endothel des Organismus aktiviert^{39,91}.

Die Inflammation ist eine Abwehrreaktion des Organismus, mit dem Ziel, den schädigenden Reiz zu inhibieren und dessen Auswirkungen zu beseitigen. Die Endothelzellschicht hat als Barriere zwischen Blutstrom und Gewebe eine wichtige Rolle und ist im physiologischen Zustand dafür zuständig, je nach Gewebe nur für bestimmte Substanzen permeabel zu sein⁹². Kommt es allerdings zur Inflammation des Endothels, so erhöht sich dessen Permeabilität⁹¹. Dies kann ein Grund für die erhöhte Aufnahme von cel-miR-39-beladenen Mikrovesikeln in die Intima der Aorta sein, da diese durch die veränderte Zusammensetzung des Blutes, wiederum ausgelöst durch den akuten Myokardinfarkt, inflammatorisch aktiviert wurde.

Gesteigerte Permeabilität kann allerdings nicht der alleinige Grund für erhöhte Vesikel-Aufnahme in das Gewebe sein, da die *Border-Zone* des Infarktes nur nach Injektion von KLF2-Mikrovesikeln einen im Trend gesteigerten cel-miR-39-Level aufwies, wohingegen die normalen Mikrovesikel nicht in der Lage waren, bis dort vorzudringen (Abb.24B). Auf eine bestimmte Art und Weise scheint die Aufnahme der intravenös injizierten Mikrovesikel in die Intima also reguliert zu sein. KLF2 hat einen anti-inflammatorischen Effekt auf Spender-Endothelzellen, deren Oberflächenmoleküle sich damit einhergehend verändern können. Wie massenspektrometrische Analysen in vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe nahelegen (Daten nicht gezeigt, n=2), unterscheidet sich das Proteom von Mikrovesikeln, die einerseits von mock- andererseits von KLF2-transduzierten HUVECs produziert wurden, in der Zusammensetzung der membrangebundenen Proteine, was für eine unterschiedliche Aufnahme durch Endothelzellen verantwortlich sein könnte. Moleküle oder Mechanismen, die dabei eine Rolle spielen, sind allerdings noch nicht bekannt und müssten in weiteren Versuchen identifiziert und weiter analysiert werden.

Die in den Mikrovesikeln verpackte cel-miR-39 ist für das murine System exogen. Nun kann argumentiert werden, dass der murine Organismus die durch die Vesikel transferierte cel-miR innerhalb der 24 h zwischen Injektion und Organentnahme größtenteils abbaut und dass dadurch die insgesamt sehr geringen Level zu erklären seien. Um diese Problematik auszuschließen, wurde der Versuch wiederholt, wobei

nun miR-92a^{-/-} Mäuse mit Mikrovesikeln injiziert wurden, die von muriner miR-92a-überexprimierenden Spenderzellen stammten. Damit war sichergestellt, dass die in den Organen detektierte miR-92a ausschließlich auf den Transfer durch die injizierten Vesikel zurückzuführen wäre, wobei es sich dennoch um eine für die Maus endogene miR handelte.

Wie die Ergebnisse belegen, konnte nach KLF2-Mikrovesikel-Injektion in der Media & Adventitia der Aorta ein signifikant erhöhter miR-92a-Level nachgewiesen werden (Abb.25D), wohingegen die Intima als innerste Schicht der Aorta keinen Anstieg zeigte (Abb.25E). Ein Grund dafür könnte sein, dass der globale *Knockout* der miR-92a sich insofern auf das Endothel der Aorta auswirkt, als dass es die Vesikel schneller aufnimmt und sie im Ganzen oder bloß ihren Inhalt in kürzerer Zeit in Richtung der äußeren Schichten weiterleitet, als dies in normalen C57BL/6J Mäusen geschieht. Ergebnisse aus anderen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe deuten in Bezug auf den globalen miR-92a^{-/-}-Phänotyp auf eine verbesserte Erholung nach akutem Myokardinfarkt im Vergleich zu Wildtyp-Tieren hin (Daten nicht gezeigt). Daher ist es möglich, dass regenerative Prozesse im Endothel der Aorta nach Induktion des Myokardinfarktes schneller stattfinden als in den C57BL/6J Mäusen. Dies würde erklären, weshalb die Mikrovesikel und damit die miR-92a zum Zeitpunkt 24 h nach Myokardinfarkt schon nicht mehr in der aortalen Intima, sondern bereits in der Adventitia/Media der Aorta detektierbar waren.

Das periphere Blut der miR-92a^{-/-} Mäuse wies im Gegensatz zum Level in C57BL/6J Mäusen (dort 2,5-fach erhöht) keinen erhöhten Level an miR-92a auf (Abb.25H). Diese Beobachtung unterstützt die These, dass die Mikrovesikel in diesem Fall schneller aus dem Blut entfernt bzw. in die unterschiedlichen Organe aufgenommen wurden, wofür bereits die Verschiebung der erhöhten miR-92a Level von aortaler Intima in Media und Adventitia der Aorta spricht. Innerhalb der Organe reichte das Maß der Aufnahme bzw. die Menge der Mikrovesikel und damit der miR-92a nicht aus, um in der real-time PCR deutliche Level messen zu können.

Sowohl in den C57BL/6J Tieren, als auch in den miR-92a^{-/-} Mäusen fanden sich im Trend leicht erhöhte Level der durch die Vesikel transferierten miRs vor allem in Leber und Niere, was ebenfalls einen Grund dafür darstellen könnte, dass die Level in

den übrigen Organen noch geringer ausfielen. Generell gilt wiederum, dass die Dosis der injizierten Mikrovesikel erhöht werden müsste, denn ggf. war diese hier zu gering, um zu signifikant erhöhten cel-miR-39- oder miR-92a-Leveln in den unterschiedlichen Geweben führen zu können.

4.5 Transfer von endothelialen Mikrovesikeln im Atherosklerose-Modell

4.5.1 Mikrovesikel von transduzierten & transfizierten Endothelzellen transportieren miR *in vivo* in die durch Atherosklerose aktivierte Milz

Um weitere Anhaltspunkte für die Aufnahme von Mikrovesikeln und deren Inhalten *in vivo* zu erhalten, wurden sie in einem zweiten Krankheitsmodell, dem Atherosklerose-Modell, injiziert. Es konnte davon ausgegangen werden, dass die 2-wöchige Fütterung einer stark fetthaltigen Diät bei den ApoE^{-/-} Mäusen eine systemische Inflammation der Arterienwände zur Folge hatte und dadurch eine Aktivierung des Immunsystems vorlag. Die von normalen oder KLF2-transduzierten Endothelzellen stammenden, cel-miR-39-beladenen Mikrovesikel wurden diesen Mäusen während der Diät jeweils 1 Mal pro Woche injiziert, als Kontrolle diente eine Injektion mit PBS. Bei den Kontrollmäusen handelte es sich um C57BL/6J Mäuse, die mit Mikrovesikeln von normalen, cel-miR-39-transfizierten Endothelzellen oder PBS injiziert wurden.

Da die Milz in der Atherosklerose eine übergeordnete Rolle spielt, entstand die Hypothese, dass die durch die systemische Inflammation aktivierte Milz die Vesikel in diesem Krankheitsmodell stärker aufnehmen und somit ihre cel-miR-39-Level deutlicher erhöht sein würden. Die Ergebnisse bestätigten diese Hypothese: so waren die cel-miR-39-Level in der Milz der Kontrollmäuse ca. 3-fach (nicht signifikant), in den ApoE^{-/-} Mäusen jedoch bis zu 12-fach (für Injektion von normalen Mikrovesikeln signifikant) erhöht (Abb.26G). Die Milz kann somit als hauptsächlicher Aufnahmeort der Mikrovesikel in ApoE^{-/-} Mäusen angesehen werden.

Die Transduktion der Mikrovesikel-Spenderzellen mit KLF2 schien deren Aufnahme nicht zu beeinflussen. Die Level innerhalb der Splenozyten zeigten zwar ebenfalls eine leichte Erhöhung nach Injektion mit cel-miR-39-beladenen Mikrovesikeln (nicht

signifikant), allerdings nicht im selben Maße wie die gesamte Milz (Abb.26H). Außerdem ist ein Unterschied zwischen C57BL/6J und ApoE^{-/-} Mäusen innerhalb der Splenozyten nicht zu erkennen. Die Aufnahme der injizierten Vesikel scheint daher unter physiologischen Bedingungen in den mononukleären Zellen der Milz stattzufinden, während nach Aktivierung durch Atherosklerose weitere Kompartimente der Milz in die Aufnahme der Vesikel involviert sind.

Die C57BL/6J Kontrolltiere dieses Versuches konnten nicht in allen Organen die Trends der Vorversuche bestätigen. Hierbei ist allerdings immer zu berücksichtigen, ob es sich um eine Injektion mit Mikrovesikeln von normalen oder aber KLF2-transduzierten Spenderzellen handelt. Da es sich weiterhin um Kontrollen zu den ApoE^{-/-} Mäusen unter fetthaltiger Diät handelte, wurden die Kontrolltiere in diesem Versuch über 2 Wochen jeweils 1 Mal mit den Vesikeln injiziert, was sie im experimentellen Design ebenfalls von den Vorversuchen unterschied (dort einmalige Injektion 24 h vor Versuchsende) und die leicht unterschiedlichen Tendenzen erklärt.

Zusammenfassend kann aus diesem Versuch geschlossen werden, dass der Transfer von cel-miR-39 über Mikrovesikel von normalen und KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen nach inflammatorischer Aktivierung des Organismus durch eine beginnende Atherosklerose effektiver stattfindet. Die Milz scheint dabei der Hauptaufnahmeort der Vesikel und damit der miR zu sein. Die für die Maus exogene cel-miR-39 sollte in keinem der Organe exprimiert sein. Auffallend ist die zum Teil (Aorta, Intima, Niere) starke Schwankung des cel-miR-39-Levels in den mit PBS injizierten Kontrolltieren. Sie ist wiederum auf den *Background* an cel-miR-39 in den Proben zurückzuführen und zeigt, dass die gemessenen miR-Level sich in den Organen (abgesehen von der Milz) in der Nähe dieser „Wasserwerte“ befinden. Dies belegt, dass trotz leichter Tendenzen letztlich nur in den Milzen von ApoE^{-/-} Tieren verlässliche Werte gemessen wurden und dass die anderen ermittelten Level, auch wenn sie kleine Trends darstellen, doch keine biologisch relevanten Level der miR widerspiegeln.

4.5.2 Mikrovesikel von KLF2-transduzierten Endothelzellen reduzieren *in vivo* den Anteil an M1-Makrophagen in der Milz leicht

Wie Hergenreider *et al.* 2012 zeigen konnten, sind Mikrovesikel von KLF2 transduzierten Endothelzellen *in vivo* durch den Transfer von in ihnen angereicherten miRs in der Lage, die Gesamtfläche atherosklerotischer Läsionen in den Arterienwänden von ApoE^{-/-} Mäusen signifikant zu reduzieren⁷⁵. In durchflusszytometrischen Untersuchungen der mononukleären Zellen der oben bereits per real-time PCR untersuchten Milzen sollte daher ermittelt werden, ob die injizierten Vesikel einen biologischen Effekt auf die Anzahl der unterschiedlichen Zellarten ausüben.

In der Gruppe der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen innerhalb der Splenozyten lag im Trend ein leichter Anstieg in den ApoE^{-/-} Mäusen gegenüber den C57BL/6J Kontrollmäusen vor (Abb.28A). Während einer systemischen Inflammation, wie sie bei der Atherosklerose vorliegt, kommt es zur extramedullären Myelopoese in der Milz⁹³. Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs) besiedeln sie im Laufe dieses Prozesses und differenzieren dort zu aktiven Monozyten, die anschließend in den Blutkreislauf entlassen werden können^{93,94}. Dies könnte erklären, weswegen die atherosklerotischen Mäuse prinzipiell eine leicht erhöhte Anzahl dieser Zellpopulation innerhalb der Splenozyten zeigten. Der Grund für einen weiteren Anstieg nach Mikrovesikel-Injektion ist bisher noch unklar und müsste in weiteren Versuchen gründlich untersucht werden.

Zu der steigenden Anzahl an HSPCs passt die ebenfalls leicht erhöhte Anzahl an Monozyten in den Milzen von ApoE^{-/-} Mäusen im Gegensatz zu C57BL/6J Mäusen (Abb.29A-C). Abgesehen davon konnten innerhalb der Monozyten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Konditionen festgestellt werden.

Bei den dendritischen Zellen erhöhte sich vor allem die Anzahl der klassischen dendritischen Zellen nach Injektion der Mikrovesikel (Abb.28D-F). Klassische dendritische Zellen sind phagozytotische Zellen, die zusätzlich in der Lage sind, Antigene nach Prozessierung zu präsentieren und stellen damit eine Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar⁹⁵. Eine zahlenmäßige Erhöhung dieser Zellpopulation innerhalb der Milz spricht daher für eine erhöhte inflammatorische Aktivität dieses Organs nach Mikrovesikel-Injektion.

Der Anteil an neutrophilen Granulozyten war innerhalb der ApoE^{-/-} Tiere im Vergleich zu den gesunden Kontrollmäusen erhöht, wenn auch nicht signifikant (Abb.28G). Vor allem die Injektion von KLF2-Mikrovesikeln führte zu einer deutlichen, allerdings ebenfalls nicht signifikanten Reduktion dieser Zellen an der Gesamtpopulation innerhalb der Milz (Abb.28G). Neutrophile Granulozyten werden zum angeborenen Immunsystem gerechnet und mit als erste Zellen zum Ort des inflammatorischen Geschehens rekrutiert. Eine Inflammation im Organismus führt gleichzeitig zu erhöhten Leveln an neutrophilen Granulozyten im Blut. Diese Zellen werden im Knochenmark gebildet, von wo aus sie in die Blutbahn entlassen werden. Ein Teil der neutrophilen Granulozyten kann in der Milz gelagert und von dort aus freigesetzt werden⁹⁶. Eine so erhöhte Anzahl an Neutrophilen in der Milz von ApoE^{-/-} Mäusen kann darauf hindeuten, dass insgesamt mehr davon produziert wurden. Eine Reduktion nach Injektion von KLF2-Mikrovesikeln könnte darauf hindeuten, dass es nicht zu einer vermehrten Einlagerung dieser Zellen in die Milz kommt oder dass die Vesikel zu einer vermehrten Freisetzung aus der Milz führen. Letzteres würde allerdings nicht zu den von Hergenreider *et al.* gezeigten Ergebnissen passen, da mehr freigesetzte Neutrophile zu einer verstärkten Atherosklerose führen würden⁹⁷.

Innerhalb der Makrophagen sorgen bei den ApoE^{-/-} Tieren sowohl die Injektion von normalen Mikrovesikeln, aber vor allem die von KLF2-Mikrovesikeln für eine leichte Reduktion an pro-inflammatorischen M1-Makrophagen (Abb.29F). Diese Reduktion kommt vermutlich nicht durch eine aktive Ausschüttung dieser Zellart zustande, da die Milz nicht dafür bekannt ist, bereits differenzierte Makrophagen in die Blutbahn abzugeben. Die Ursache für diese Verminderung durch Injektion von KLF2-Mikrovesikeln ist noch unklar, das Ergebnis spricht aber für eine weniger inflammatorisch aktive Milz. Dieser Effekt der KLF2-Mikrovesikel wurde dabei nicht durch die von uns getesteten microRNAs miR-145, miR-150, miR-126 und miR-27b vermittelt (Abb.31A-D). Ob andere miRs hierbei eine Rolle spielen, müsste weiter untersucht werden.

In weiteren Versuchen könnte die Dauer der stark fetthaltigen Diät von 2 Wochen auf beispielsweise 6 Wochen erhöht werden, während derer wöchentlich oder mehrmals

pro Woche die Mikrovesikel injiziert werden würden. Dies hätte eine stärkere Ausprägung der Atherosklerose zur Folge und könnte somit auch zu einer deutlicher sichtbaren Aufnahme und Wirkung der Mikrovesikel führen. Prinzipiell ist auch hier anzumerken, dass eine Erhöhung der Mikrovesikel-Dosis zu stärkeren Effekten führen könnte.

4.6 Inkubation von Makrophagen mit Mikrovesikeln von transduzierten Endothelzellen führt *in vitro* zu einer Erhöhung der M1-Marker und der Zellzahl

Die reduzierte Anzahl von M1-Makrophagen in ApoE^{-/-} Mäusen nach Injektion sollte anschließend in diesem *in vitro*-Versuch weiter untersucht werden. Hierbei war die Frage, ob es sich um einen generellen Effekt der Vesikel auf Makrophagen handelte. Hierbei wurden peritoneale Makrophagen von C57BL/6J Mäusen *in vitro* zunächst mit Mikrovesikeln von mock- oder KLF2-transduzierten murinen Endothelzellen inkubiert, als Kontrolle diente PBS. Anschließend wurden Faktoren ins Medium gegeben, die die Differenzierung der Zellen zu M1- oder M2-Makrophagen anregen sollten. Die auf mRNA Ebene per real-time PCR gemessenen Level der M1-Marker IL-1 β und TNF- α zeigten einen generellen Anstieg nach Behandlung der Zellen mit LPS und IFN- γ (Abb.32A+B), wohingegen der M2-Marker Fizz-1 nach Behandlung mit IL-4 deutlich erhöht war (Abb.32C). Diese Ergebnisse zeigen, dass die erwünschte Differenzierung durch die zugegebenen Substanzen erfolgreich war. Von dem zweiten gemessenen M2-Marker, Arginase-1, hätte man jedoch zunächst ebenfalls in der mit IL-4 behandelten Kondition eine prinzipiell höhere Expression im Vergleich zu den beiden anderen Konditionen erwartet, was nicht bestätigt werden konnte (Abb.32D). In der mit LPS und IFN- γ behandelten Kondition stieg Arg-1 unerwarteterweise ebenfalls an. Arg-1 kann in diesem Versuch nicht als verlässlicher Marker für M2-Makrophagen gewertet werden, da 2008 gezeigt werden konnte, dass auch die durch LPS stimulierten Makrophagen dieses Enzym verstärkt exprimieren können⁹⁸. Ein weiterer Grund für die geringere Aussagekraft von Arg-1 in diesem Experiment ist, dass es sich dabei um ein Enzym handelt, dessen Expressierung und Aktivität in Konkurrenz zu der in Makrophagen exprimierten, induzierbaren

Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) steht. Sobald also in den Makrophagen, beispielsweise ausgelöst durch LPS- und IFN- γ -Behandlung, iNOS verstärkt exprimiert wird, wird gleichzeitig der Level an Arg-1 auf Proteinebene herunterreguliert, da sie um das Substrat L-Arginin konkurrieren. Wird Arg-1 also vernachlässigt, so sprechen die Level der unterschiedlichen M1- und M2-Marker unter basalen Bedingungen nach Inkubation mit mock und vor allem KLF2-Mikrovesikeln für eine erhöhte Differenzierung in Richtung M1-Makrophagen (Abb.32A+B). Der M2-Marker (Fizz-1) zeigt gleichzeitig eine dazu passende geringere Expression (Abb.32C).

Vor diesem Hintergrund kann geschlossen werden, dass die mock- und in noch höherem Maße die KLF2-Vesikel, Makrophagen unter basalen und aktivierten Bedingungen anregen, in Richtung M1 zu differenzieren. Dieses Ergebnis überrascht vor dem Hintergrund, dass innerhalb der Splenozyten *in vivo* der Anteil an M1-Makrophagen an der Gesamtpopulation nach Mikrovesikel-Injektion eher sank. Für diese Diskrepanz kommen unterschiedliche Gründe in Frage. Sicherlich kann man einen *in vitro*- nicht direkt mit einem *in vivo*-Experiment vergleichen, da innerhalb eines komplexen Organismus sehr viel mehr Faktoren für ein bestimmtes Geschehen verantwortlich sind. Weiterhin handelt es sich in beiden Versuchen nicht um Makrophagen desselben Ursprungs, denn *in vivo* wurden Makrophagen innerhalb der Milz untersucht, wohingegen für das *in vitro*-Experiment Makrophagen der Bauchhöhle verwendet wurden. Letztlich unterscheiden sich die Versuche auch in der Art und Weise der Aktivierung der Immunzellen. Erfolgte dies im *in vivo*-Experiment durch das genetische Mausmodell des ApoE-*knockouts* und einer dadurch induzierten Atherosklerose, so wurden die Immunzellen *in vitro* erst nach Entnahme aus der Maus durch externe Faktoren aktiviert und zu einer konkreten Differenzierung angeregt.

Die Ergebnisse dieses *in vitro*-Versuches zeigten außerdem, dass die Mikrovesikel einen proliferativen Effekt auf die peritonealen Makrophagen aller getesteten Konditionen hatten. Mit der vollständigen Differenzierung einer Zelle sinkt im Regelfall ihr Proliferationsvermögen. Makrophagen werden somit prinzipiell als eine post-mitotische Zellart angesehen, allerdings zeigten verschiedene Publikationen, dass es Gewebemakrophagen gibt, unter ihnen auch peritoneale Makrophagen, die durchaus

in der Lage sind zu proliferieren. Die Proliferation kann dabei durch ein inflammatorisches Geschehen ausgelöst sein oder stattfinden, um die lokale Makrophagen-Population aufrechtzuerhalten^{86,99}. Welche Signalwege innerhalb der in diesem Versuch kultivierten Makrophagen durch Inkubation mit Mikrovesikeln reguliert und aus welchen Gründen sie somit proliferierten bleibt unklar und müsste in weitergehenden Versuchen ermittelt werden.

4.7 Fazit und Ausblick

Bisher konnten verschiedene Studien zeigen, dass die von *in vitro* kultivierten diversen Zellarten produzierten extrazellulären Vesikel *in vitro* und *in vivo* verschiedenste miRs in unterschiedliche Zellen und Gewebearten transferieren und dort biologische Funktionen ausüben können (Tabelle 30).

2009 konnten Zerneck *et al.* zeigen, dass während der Atherosklerose produzierte apoptotische Körperchen von Endothelzellen, die unter anderem miR-126 enthielten, von benachbarten Endothelzellen aufgenommen wurden und dort durch Hemmung der miR-126-Zielgen-mRNA eine atheroprotektive Wirkung ausübten⁵⁸. Bei den untersuchten extrazellulären Vesikeln handelte es sich um apoptotische Körperchen, die natürlich eine andere Biogenese zeigen als die hier untersuchten Mikrovesikel. Daher sind die Experimente nicht direkt miteinander zu vergleichen. Die Injektion der Vesikel im Atherosklerose-Modell erfolgte zwar auch i.v., allerdings doppelt so häufig. Zusätzlich muss gesagt werden, dass die Dauer der den ApoE^{-/-} Mäusen gefütterten stark fetthaltigen Diät bei 6 Wochen lag, wohingegen die für diese Arbeit verwendeten ApoE^{-/-} Mäuse lediglich 2 Wochen lang mit der Diät gefüttert wurden. Für weitere Versuche wäre also zu überlegen, die Dauer der fetthaltigen Diät zu erhöhen, und damit insgesamt stärker aktivierte Gewebe zu untersuchen, die unter Umständen mehr Vesikel aufnehmen würden. Gleichzeitig könnte die Häufigkeit der Injektionen erhöht werden.

2012 zeigten Fonsato *et al.* *in vitro* und *in vivo* den Transfer von miR-31 und -451 über Mikrovesikel von Stammzellen der Leber zu hepatozellulären Karzinomzellen¹⁰⁰. Sie gehen davon aus, dass diese so transferierten miRs Tumorstadium und -größe verringern können, also die Proliferation der Tumorzellen senken und die Apoptose-

rate steigern. Die Unterschiede zwischen dem hier überprüften und dem von Fonsato *et al.* gezeigten Transfer sind grundlegend und erklären die dort gezeigten stärkeren biologischen Effekte der über Mikrovesikel transferierten miRs. Abgesehen von anderen Spender- und Empfängerzellarten und zusätzlich zu einer anderen Aufreinigung der Mikrovesikel wurden sie *in vivo* direkt in den Tumor injiziert, wohingegen die Injektion für die *in vivo*-Versuche im hiesigen Fall stets intravenös erfolgte. Natürlich kann bei direkter Applikation lokal ein wesentlich höherer miR-Level erwartet werden, es stellt sich hierbei allerdings die Frage, inwieweit diese Applikationsart tatsächlich klinisch umsetzbar wäre. In Bezug auf den Myokardinfarkt wäre eine lokale Applikation durch Injektion ins Myokard nicht denkbar. Würde man die Vesikel möglichst lokal applizieren wollen, so könnte man sie allenfalls über einen Katheter in die Region des Infarktes zu bringen versuchen. In der Atherosklerose ist eine lokale Injektion ebenfalls nicht durchzuführen, da es sich um eine systemische Erkrankung der Arterien handelt. In jedem Fall ist eine intravenöse Injektion des miR-Transportvehikels die sinnvollste Variante und gibt am ehesten Aufschluss über das Potential der Mikrovesikel als mögliche, auch klinisch umsetzbare, Transportvehikel für biologisch funktionelle miRs. Die vorliegende Arbeit zeigt in diesem Zusammenhang, dass Mikrovesikel *in vitro*, aber zum Teil auch *in vivo*, als Möglichkeit miRs zu transferieren in Frage kommen. *In vivo* allerdings war die Effektivität noch äußerst gering. Kommende Versuche müssten zeigen, ob eine Erhöhung der i.v.-applizierten Vesikel-Dosis höhere und damit effektivere Level der miR in den Geweben bewirken würde. Sollte dies der Fall sein, so wäre der nächste Schritt Methoden herauszuarbeiten, die Mikrovesikel beispielsweise über bestimmte Oberflächenmoleküle spezifisch zu richten, sodass es zu möglichst wenig *off-target* Effekten käme. Anschließend könnte man die Mikrovesikel-Spenderzellen mit denjenigen miRs transfizieren, von denen gezeigt wurde, dass sie Atherosklerose reduzieren oder die Regeneration nach Myokardinfarkt verbessern.

Zhang *et al.* konnten 2013 zeigen, dass die von Monozyten in Mikrovesikel sekretierte miR-150 maßgeblich an der Regulation von Angiogenese beteiligt ist¹⁰¹. Dabei wurden zum einen Mikrovesikel einer Monozyten-Zelllinie und zum anderen Mikrovesikel aus dem Plasma von Atherosklerose-Patienten aufgereinigt und i.v. in Mäuse in-

jiziert, denen zuvor ein Matrigel *Plug* eingesetzt worden war, anhand dessen Angiogenese untersucht werden sollte. Es konnte gezeigt werden, dass die miR-150-beladenen Vesikel *in vivo* eine verstärkte Angiogenese bewirkten. Im Gegensatz zu den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimenten, wurden die Mikrovesikel an vier aufeinanderfolgenden Tagen appliziert und die Tiere erst nach weiteren 8 Tagen getötet. Es wäre für nachfolgende Experimente also zu überlegen, nicht nur die Menge der Vesikel, sondern, wie oben bereits erwähnt, auch die Häufigkeit der Applikation zu erhöhen.

Die Kommunikation von Monozyten mit Endothelzellen über Mikrovesikel während der Atherogenese konnte also von Zhang *et al.*, aber auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden¹⁰². Es liegt daher nicht fern zu vermuten, dass die umgekehrte Kommunikation ebenfalls möglich sei. Weitere Versuche müssten in diesem Zusammenhang zeigen, ob i.v. injizierte Mikrovesikel von Endothelzellen direkt von im Blut zirkulierenden Monozyten aufgenommen werden können oder ob diese Aufnahme innerhalb der Milz stattfinden würde. Der in einigen der hier durchgeführten *in vivo*-Versuche erhöhte cel-miR39 Level im Blut könnte bedeuten, dass die Mikrovesikel noch im Blut zirkulieren, andererseits wäre es ebenso möglich, dass sie bereits von im Blut zirkulierenden Zellen (z.B. Monozyten) aufgenommen wurden. Weitere Untersuchungen in diesem Bereich wären nötig, um diese Fragen abschließend beantworten zu können.

Die hier diskutierten Publikationen dienten beispielhaft der Auseinandersetzung der vorliegenden Arbeit im Kontext der bisher gezeigten interzellulären Kommunikation über miR-beladene extrazelluläre Vesikel. Die dadurch aufgezeigte Problematik der Auswahl passender Spender- und Empfängerzellen, der richtigen Maus-Modelle, Häufigkeit der Vesikel-Injektionen und Dosis der dabei applizierten Vesikel werden zusammengefasst für die in den hier gezeigten *in vivo*-Experimenten unzureichenden cel-miR-39-Level in den untersuchten Geweben verantwortlich sein. Für nachfolgende Projekte wäre es daher interessant herauszufinden, wie und nach welchen Kriterien Mikrovesikel von Endothelzellen beladen werden und ob es sich dabei um einen

aktiv/selektiven Prozess handelt. Falls dem so wäre, könnten anschließend die zugrundeliegenden Mechanismen und deren Regulation erforscht werden.

Tabelle 30: Beispiele funktioneller miRs in interzellulärer Kommunikation^{64,100}.

Spenderzellart	Empfängerzellart/ Gewebe	EV	miR	Funktion
Endothelzellen	Endothelzellen	Apopt. Körperchen	miR-126	Atherosklerose ↓
Stammzellen der Leber	Hepatozelluläre Karzinomzellen	MV	miR-451 miR-31	Proliferation ↓ Apoptose ↑
Monozyten	Endothelzellen	MV	miR-150	Migration ↑ Angiogenese ↑

5 Zusammenfassung

Innerhalb der letzten Jahre wurde gezeigt, dass interzelluläre Kommunikation nicht nur über direkten Zell-Zell-Kontakt, sondern auch über lösliche Trägerstoffe, wie beispielsweise extrazelluläre Vesikel erfolgen kann. Eine ihrer Untergruppen, die 100-1000 nm großen, durch Abschnürung der Plasmamembran entstehenden Mikrovesikel standen im Fokus dieser Arbeit. Da bereits demonstriert wurde, dass Mikrovesikel von Endothelzellen microRNAs (miRs) zu anderen Zellarten transportieren können, war das Ziel dieser Studie zu untersuchen, ob dabei ein spezifisch gerichteter Transfer an bestimmte Zielzellen bzw. Zielgewebe vorliegt.

Es ist bekannt, dass Endothelzellen, die laminarer Strömung und damit einhergehend erhöhter Schubspannung ausgesetzt sind, erhöhte Level des Transkriptionsfaktors *Krüppel-like factor 2* (KLF2) exprimieren, was zu einer Veränderung der Zusammensetzung des Inhalts der produzierten Mikrovesikel führen kann. Im Verlauf dieser Arbeit sollte daher ebenfalls die Frage beantwortet werden, ob die KLF2-Expression der Mikrovesikel-produzierenden Endothelzellen Auswirkungen auf deren Aufnahme durch Empfängerzellen (*in vitro*) oder Empfängerewebe (*in vivo*) hat.

In *in vitro*-Versuchen wurde die vesikuläre miR (cel-miR-39) erfolgreich, aber durchaus in unterschiedlichem Maße in alle untersuchten Empfängerzellarten transferiert. Nach Behandlung mit Mikrovesikeln konnten dabei in Kardiomyozyten, gefolgt von vaskulären glatten Muskelzellen höhere miR-Level gemessen werden als in Endothelzellen. Dabei transferierten die Mikrovesikel von KLF2-Spenderzellen zwar insgesamt mehr der miR, was in diesem Fall allerdings nicht an einer verstärkten Aufnahme, sondern lediglich an bereits in den Mikrovesikel-Spenderzellen erhöhten miR-Leveln lag. Zusätzlich dazu wurden Immunzellen, genauer Monozyten und von diesen zu Makrophagen differenzierte Zellen untersucht. Es stellte sich heraus, dass die weitestgehend undifferenzierten Monozyten gefolgt von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen die höchste Aufnahmerate der Mikrovesikel aufwiesen. Innerhalb aller untersuchten Immunzellen lag im Vergleich zur Kontrolle eine höhere Transfer-effektivität nach Inkubation mit KLF2-Mikrovesikeln vor.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass es quantitative Unterschiede und somit einen gerichteten Transfer der Mikrovesikel von Endothelzellen zu diversen anderen Zellarten gibt, und dass eine vorangegangene KLF2-Transduktion der Spender-Endothelzellen die Aufnahme der Mikrovesikel in Immunzellen verstärkt.

In vivo konnte eine erfolgreiche Aufnahme der miR-beladenen Mikrovesikel in der Milz von atherosklerotisch aktivierten ApoE^{-/-} Mäusen gezeigt werden, wohingegen in den übrigen untersuchten Organen (Herz, Media & Adventitia der Aorta, aortale Intima, Leber, Niere) nur geringe miR-Spiegel gemessen wurden, die vermutlich nicht als biologisch relevant einzuordnen sind. Des Weiteren waren in durchflusszytometrischen Analysen der Splenozyten keine deutlichen Veränderungen nach Mikrovesikel-Injektion zu erkennen. Lediglich ein leichter Trend zur Reduktion an M1-Makrophagen, sowie zur Reduktion der neutrophilen Granulozyten innerhalb der Milz der ApoE^{-/-} Mäuse nach Injektion von KLF2-Vesikeln konnte beobachtet werden. Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass Mikrovesikel von sowohl untransduzierten, als auch KLF2-transduzierten Endothelzellen die in ihnen verpackte miR hauptsächlich in die Milz von atherosklerotisch aktivierten Mäusen transportieren. Die hier verwendeten und injizierten Vesikel hatten dabei geringe Auswirkungen auf die Zusammensetzung der mononukleären Zellen der Milz. Prinzipiell könnten endotheliale Mikrovesikel eine Möglichkeit darstellen ausgewählte miRs zur Milz von atherosklerotisch aktivierten ApoE^{-/-} Mäusen zu transferieren.

6 Summary

In the past few years, extracellular vesicles have been described to take part in cell-to-cell communication. A sub-group of these extracellular vesicles called microvesicles, which are 100-1000 nm in size and are produced through budding off cellular plasma membranes, are in the focus of this study. As microvesicles derived from endothelial cells are known to transfer microRNAs (miRs) to several other cell types, the aim of this study was to elucidate whether such miR-carrying microvesicles are capable of delivering their cargo to specific recipient cells and tissues. It was shown that endothelial cells exposed to laminar flow experience shear stress, which induces expression of the transcription factor Krüppel-like factor 2 (KLF2). Higher KLF2 expression in turn is able to change the composition of endothelial microvesicle-content. In order to answer the question whether KLF2 expression in microvesicle-producing endothelial cells induces differences of vesicle-uptake, endothelial cells were transduced with KLF2 and their microvesicles were analysed for uptake in cells *in vitro* and in mice.

In the *in vitro* studies, vesicular miR (cel-miR-39) was successfully transferred into all cell types tested, although not to the same extent. After treatment with microvesicles, cardiomyocytes showed higher miR levels than vascular smooth muscle cells, which in turn showed higher uptake than endothelial cells. MiR levels in the recipient cells were increased by overexpression of KLF2 within the donor cells. However this was not due to a better uptake but because of already higher miR-levels within the microvesicle-producing cells. We also investigated immune cells, particularly the uptake of microvesicles in monocytes as well as monocyte-derived M1 and M2 macrophages. We found that mostly undifferentiated monocytes showed the highest vesicle uptake, followed by M1 macrophages. Interestingly, KLF2 overexpression in the donor cells increased uptake of the derived microvesicles within all immune cells. In summary, it can be stated that quantitative differences in uptake exist concerning transfer of miRs via microvesicles from endothelial cells to a variety of recipient cell types *in vitro*. Additionally, a preceding transduction of microvesicle-producing endothelial cells with KLF2 enhances transfer of miRs to immune cells.

In vivo, a significant enrichment of miR-carrying microvesicles was only observed in the spleen of ApoE^{-/-} atherosclerotic mice whereas the miR levels detected within other organs (heart, media & adventitia of the aorta, aortic intima, liver, kidney) were indistinguishable from background and likely biologically irrelevant. The composition of splenocytes after injection of microvesicles did not change considerably. Only a slight reduction in M1 macrophages as well as a reduction in neutrophilic granulocytes within the spleens of ApoE^{-/-} mice could be observed after treatment with miR-containing microvesicles derived from KLF2 overexpressing endothelial cells.

These results show that microvesicles coming from untransduced as well as KLF2 transduced endothelial cells transfer miRs mainly into the spleen of ApoE^{-/-} atherosclerotic mice. After injection of microvesicles only slight changes were observed concerning the composition of splenic mononuclear cells. All in all endothelial microvesicles could serve as a vehicle in order to deliver specific miRs into the spleen of ApoE^{-/-} atherosclerotic mice.

Referenzen

1. Nickel, Schummer & Seiferle. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. (1996).
2. Circulation. *Biology-Forums.com* at <http://biology-forums.com/gallery/14755_10_09_12_7_22_08_85152044.jpeg>
3. Libby, P., Ridker, P. M. & Hansson, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **473**, 317–325 (2011).
4. Marieb, E. N. *Human Anatomy*. (2012).
5. Thews & Vaupel. *Vegetative Physiologie*. (2005).
6. Malek, A. M., Alper, S. L. & Izumo, S. Hemodynamic Shear Stress and Its Role in Atherosclerosis. *J. Am. Med. Assoc.* **282**, 2035–2042 (1999).
7. Boon, R. A., Hergenreider, E. & Dimmeler, S. Atheroprotective mechanisms of shear stress-regulated microRNAs. *Thromb. Haemost.* **108**, 616–620 (2012).
8. Zarins, C. K. *et al.* Carotid Bifurcation Atherosclerosis - Quantitative Correlation of Plaque Localization with Flow Velocity Profiles and Wall Shear Stress. *Circ. Res.* **53**, 502–514 (1983).
9. Von der Thüsen, J. H., van Berkel, T. J. C. & Biessen, E. A. L. Induction of Rapid Atherogenesis by Perivascular Carotid Collar Placement in Apolipoprotein E-Deficient and Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Circulation* **103**, 1164–1170 (2001).
10. Hahn, C. & Schwartz, M. a. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**, 53–62 (2009).
11. WHO | The top 10 causes of death. *Fact sheet N°310 (Updated May 2014)* (2014). at <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html>>
12. Sandison AT. Degenerative vascular disease in the egyptian mummy. *Med Hist* **6**, 77–81 (1962).
13. Ruffer, M. A. On arterial lesions found in Egyptian mummies (1580 B.C.—525 A.D.). *J. Pathol. Bacteriol.* **15**, 453–462 (1911).
14. Mayerl, C. *et al.* Atherosclerosis research from past to present - on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch.* **449**, 96–103 (2006).

15. Hansson, G. K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* **352**, 1685–1695 (2005).
16. Hansson, G. K. Immune Mechanisms in Atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **947**, 157–165; discussion 165–166 (2001).
17. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2045–2051 (2012).
18. Simionescu, M. Implications of Early Structural-Functional Changes in the Endothelium for Vascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 266–274 (2007).
19. Gimbrone, M. a., Topper, J. N., Nagel, T., Anderson, K. R. & Garcia-Cardena, G. Endothelial Dysfunction, Hemodynamic Forces, and Atherogenesis. *Thromb. Haemost.* **82**, 722–726 (1999).
20. Tabas, I., Williams, K. J. & Borén, J. Subendothelial Lipoprotein Retention as the Initiating Process in Atherosclerosis - Update and Therapeutic Implications. *Circulation* **116**, 1832–1844 (2007).
21. Chiu, J.-J. & Chien, S. Effects of Disturbed Flow on Vascular Endothelium: Pathophysiological Basis and Clinical Perspectives. *Physiol. Rev.* **91**, 327–387 (2011).
22. Li, H., Cybulsky, M. I., Gimbrone, M. a & Libby, P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler. Thromb.* **13**, 197–204 (1993).
23. Cybulsky, M. I. & Gimbrone, M. a. Endothelial Expression of a Mononuclear Leukocyte Adhesion Molecule During Atherogenesis. *Science* **251**, 788–791 (1991).
24. Williams, H. J., Fisher, E. A. & Greaves, D. R. Macrophage differentiation and function in atherosclerosis; opportunities for therapeutic intervention? *J. Innate Immun.* **4**, 498–508 (2012).
25. Gordon, S. & Martinez, F. O. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* **32**, 593–604 (2010).
26. Gui, T., Shimokado, A., Sun, Y., Akasaka, T. & Muragaki, Y. Diverse Roles of Macrophages in Atherosclerosis: From Inflammatory Biology to Biomarker Discovery. *Mediators Inflamm.* **2012**, (2012).

27. Rosenfeld, M. E. *et al.* Macrophage Colony-stimulating Factor mRNA and Protein in Atherosclerotic Lesions of Rabbits and Humans. *Am J Pathol* **140**, 291–300 (1992).
28. Clinton, S. K. *et al.* Macrophage Colony-stimulating Factor Gene Expression in Vascular Cells and in Experimental and Human Atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* **140**, 301–316 (1992).
29. Colin, S., Chinetti-gbaguidi, G. & Staels, B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol. Rev.* **262**, 153–166 (2014).
30. Libby, P., Aikawa, M. & Schönbeck, U. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1529**, 299–309 (2000).
31. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233–241 (2000).
32. Glass, C. K. & Witztum, J. L. Atherosclerosis : The Road Ahead. *Cell* **104**, 503–516 (2001).
33. Tabas, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. **10**, 36–46 (2010).
34. Libby, P., Ridker, P. M. & Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1135–1143 (2002).
35. Chinetti-Gbaguidi, G., Colin, S. & Staels, B. Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* **12**, 10–17 (2015).
36. Zhou, X., Robertson, A. K. L., Hjerpe, C. & Hansson, G. K. Adoptive Transfer of CD4⁺ T Cells Reactive to Modified Low-Density Lipoprotein Aggravates Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 864–870 (2006).
37. Ait-Oufella, H. *et al.* Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat. Med.* **12**, 178–180 (2006).
38. Rezende, A. B. *et al.* Splenectomy Increases Atherosclerotic Lesions in Apolipoprotein E Deficient Mice. *J. Surg. Res.* **171**, 231–236 (2011).
39. Dutta, P. *et al.* Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature* **000**, 1–5 (2012).
40. Swirski, F. K. & Nahrendorf, M. Leukocyte Behavior in Atherosclerosis, Myocardial Infarction, and Heart Failure. *Science* **339**, 161–6 (2013).
41. Libby, P. Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S352–S357 (2009).

42. Seropian, I. M., Sonnino, C., Van Tassell, B. W., Biasucci, L. M. & Abbate, A. Inflammatory markers in ST- elevation acute myocardial infarction. *Eur. Hear. J. Acute Cardiovasc. Care* (2015). doi:10.1177/2048872615568965
43. St, M. G., Sutton, J. & Sharpe, N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction: Pathophysiology and Therapy. *Circulation* **101**, 2981–2988 (2000).
44. Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921 (2001).
45. Elgar, G. & Vavouri, T. Tuning in to the signals: noncoding sequence conservation in vertebrate genomes. *Trends Genet.* **24**, 344–352 (2008).
46. Rinn, J. L. & Chang, H. Y. Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 145–166 (2012).
47. Li, Z. & Rana, T. M. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 622–638 (2014).
48. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
49. Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **42**, 68–73 (2014).
50. Bronze-Da-Rocha, E. MicroRNAs Expression Profiles in Cardiovascular Diseases. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
51. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509–524 (2014).
52. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* **11**, 228–234 (2009).
53. Di Stefano, V., Zaccagnini, G., Capogrossi, M. C. & Martelli, F. microRNAs as peripheral blood biomarkers of cardiovascular disease. *Vascul. Pharmacol.* **55**, 111–118 (2011).
54. Small, E. M. & Olson, E. N. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* **469**, 336–342 (2011).
55. Ebert, M. S., Neilson, J. R. & Sharp, P. A. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat. Methods* **4**, 721–726 (2007).

56. Zhao, Y. *et al.* Dysregulation of Cardiogenesis, Cardiac Conduction, and Cell Cycle in Mice Lacking miRNA-1-2. *Cell* **129**, 303–317 (2007).
57. Joladarashi, D., Thandavarayan, R., Babu, S. & Krishnamurthy, P. Small Engine, Big Power: MicroRNAs as Regulators of Cardiac Diseases and Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 15891–15911 (2014).
58. Zerneck, A. *et al.* Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci. Signal.* **2**, ra81 (2009).
59. Dutzmann, J., Daniel, J., Bauersachs, J. & Sedding, D. G. MiR-92a – a key player in cardiovascular remodeling. *Rna Dis.* 10–12 (2015). doi:10.14800/rd.371
60. Bonauer, A. *et al.* MicroRNA-92a Controls Angiogenesis and Functional Recovery of Ischemic Tissues in Mice. *Science* **324**, 1710–1713 (2009).
61. Loyer, X. *et al.* Inhibition of MicroRNA-92a Prevents Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis in Mice. *Circ. Res.* **114**, 434–443 (2013).
62. Boettger, T. *et al.* Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *J. Clin. Invest.* **119**, (2009).
63. Weickmann, J. L. & Glitz, D. G. Human Ribonucleases. Quantitation of pancreatic-like enzymes in serum, urine, and organ preparations. *J. Biol. Chem.* **257**, 8705–8710 (1982).
64. Boon, R. a. & Vickers, K. C. Intercellular Transport of MicroRNAs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 186–192 (2013).
65. Wagner, J. *et al.* Characterization of Levels and Cellular Transfer of Circulating Lipoprotein-Bound MicroRNAs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 1392–1400 (2013).
66. Arroyo, J. D. *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5003–5008 (2011).
67. Loyer, X., Vion, A. C., Tedgui, A. & Boulanger, C. M. Microvesicles as Cell–Cell Messengers in Cardiovascular Diseases. *Circ. Res.* **114**, 345–353 (2014).
68. Zhou, J. *et al.* Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Turnover by Endothelial Cell-Secreted MicroRNA-126: Role of Shear Stress. *Circ. Res.* **113**, 40–51 (2013).

69. Raposo, G. *et al.* B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles. *J. Exp. Med.* **183**, 1161–1172 (1996).
70. EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O. & Wood, M. J. A. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 347–57 (2013).
71. Turturici, G., Tinnirello, R., Sconzo, G. & Geraci, F. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **306**, C621–33 (2014).
72. Borges, F. T., Reis, L. a & Schor, N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **46**, 824–30 (2013).
73. Dignat-George, F. & Boulanger, C. M. The Many Faces of Endothelial Microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 27–33 (2011).
74. Zhang, Y. *et al.* Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Mol. Cell* **39**, 133–144 (2010).
75. Hergenreider, E. *et al.* Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat. Cell Biol.* **14**, 249–256 (2012).
76. Cantaluppi, V. *et al.* Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia–reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* **82**, 412–427 (2012).
77. Schorey, J. S., Cheng, Y., Singh, P. P. & Smith, V. L. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep.* **16**, 24–43 (2015).
78. Solary, E. When monocyte life hangs by a thread. *Bloodjournal* **119**, 2699–2700 (2012).
79. Sluijter, J. P. G., Verhage, V., Deddens, J. C., Van Den Akker, F. & Doevendans, P. a. Microvesicles and exosomes for intracardiac communication. *Cardiovasc. Res.* **102**, 302–311 (2014).
80. Dekker, R. J. *et al.* Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Krüppel-like factor (KLF2). *Blood* **100**, 1689–1698 (2002).
81. SenBanerjee, S. *et al.* KLF2 Is a Novel Transcriptional Regulator of Endothelial Proinflammatory Activation. *J. Exp. Med.* **199**, 1305–1315 (2004).

82. Huddleson, J. P., Srinivasan, S., Ahmad, N. & Lingrel, J. B. Fluid shear stress induces endothelial KLF2 gene expression through a defined promoter region. *Biol.Chem.* **385**, 723–729 (2004).
83. McConnell, B. B. & Yang, V. W. Mammalian Krüppel-Like Factors in Health and Diseases. *Physiol. Rev.* 1337–1381 (2010).
doi:10.1152/physrev.00058.2009.Mammalian
84. Dekker, R. J. *et al.* Endothelial KLF2 Links Local Arterial Shear Stress Levels to the Expression of Vascular Tone-Regulating Genes. *Am. J. Pathol.* **167**, 609–618 (2005).
85. Dekker, R. J. *et al.* KLF2 provokes a gene expression pattern that establishes functional quiescent differentiation of the endothelium. *Blood* **107**, 4354–4363 (2006).
86. Jenkins, S. J. *et al.* Local Macrophage Proliferation, Rather than Recruitment from the Blood, Is a Signature of TH2 Inflammation. *Science (80-.)*. **332**, 1284–1288 (2011).
87. Briken, V. & Mosser, D. M. Editorial: Switching on arginase in M2 macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **90**, 839–841 (2011).
88. Murray, P. J. *et al.* Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
89. Sanson, M., Distel, E. & Fisher, E. a. HDL Induces the Expression of the M2 Macrophage Markers Arginase 1 and Fizz-1 in a STAT6-Dependent Process. *PLoS One* **8**, 6–13 (2013).
90. Doddaballapur, A. *et al.* Laminar Shear Stress Inhibits Endothelial Cell Metabolism via KLF2-Mediated Repression of PFKFB3. *Arter. Thromb Vasc Biol.* **35**, 137–145 (2015).
91. Michiels, C. Endothelial Cell Functions. *J. Cell. Physiol.* **196**, 430–443 (2003).
92. Favero, G., Paganelli, C., Buffoli, B., Rodella, L. F. & Rezzani, R. Endothelium and Its Alterations in Cardiovascular Diseases: Life Style Intervention. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
93. Dutta, P. *et al.* Macrophages retain hematopoietic stem cells in the spleen via VCAM-1. **212**, 497–512 (2015).
94. Robbins, C. S. *et al.* Extramedullary Hematopoiesis Generates Ly-6Chigh Monocytes That Infiltrate Atherosclerotic Lesions. *Circulation* **125**, 364–374 (2012).

95. Satpathy, A. T., Wu, X., Albring, J. C. & Murphy, K. M. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* **13**, 1145–54 (2012).
96. Swirski, F. K. *et al.* Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science* **325**, 612–616 (2009).
97. Hartwig, H., Roig, C. S., Daemen, M., Lutgens, E. & Soehnlein, O. Neutrophils in atherosclerosis. *Hamostaseologie* 1–7 (2014).
98. El Kasmi, K. C. *et al.* Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat. Immunol.* **9**, 1399–1406 (2008).
99. Jenkins, S. J. *et al.* IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *J. Exp. Med.* **210**, 2477–2491 (2013).
100. Fonsato, V. *et al.* Human Liver Stem Cell-Derived Microvesicles Inhibit Hepatoma Growth in SCID Mice by Delivering Antitumor MicroRNAs. *Stem Cells* **30**, 1985–1998 (2012).
101. Li, J. *et al.* Microvesicle-mediated transfer of microRNA-150 from monocytes to endothelial cells promotes angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **288**, 23586–23596 (2013).
102. Hulsmans, M. & Holvoet, P. MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovasc. Res.* **100**, 7–18 (2013).

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.



Frankfurt, den 02. Juni 2015

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Stefanie für die Möglichkeit bedanken an diesem Institut promovieren und dabei so unglaublich Vieles lernen zu dürfen! Stefanie, danke für Deine Betreuung in den letzten 3 Jahren, danke für Deinen Input, Deine Unterstützung, Dein Vertrauen, danke für 3 unvergessliche Weihnachtsfeiern und Ski-Retreats und vor allem danke für das Wissen jederzeit mit kleinen oder großen Problemen zu Dir kommen zu können!

Vielen Dank auch an Prof. Diener für die unkomplizierte Betreuung aus Gießen, für den Besuch hier im Institut und die unverzügliche Beantwortung all meiner Fragen! Vor allen Dingen danke für die unglaublich schnelle, präzise und hilfreiche Korrektur meiner Arbeit!

Danke auch an die besten 3 Postdocs Tina, Reinier und Nico für Eure immer hilfreiche Unterstützung – man kommt oft mit einem komischen Gefühl im Bauch zu Euch, weil man ein Problem hat, das man alleine nicht lösen kann und eigentlich IMMER verlässt man den Raum beruhigt und mit neuen Ideen wieder – danke dafür Ihr Lieben!

Danke sowieso an das gesamte Labor in alter und neuerer Zusammensetzung für die herzliche und fürsorgliche Aufnahme, für die Beantwortung all meiner Fragen, die Hilfe und für den ganzen Spaß, den wir alle miteinander hatten! Ganz besonders möchte ich mich dafür bei Ariane, Katha, Jasmin, Andrea, Evi, Marion, Shemsinator, Patrick (Sherlock), Reinier (The! dancer), Nico, Timon, Niels, Angie, Yosif und Tina bedanken, denn ohne Eure Geduld und Hilfestellung wäre ich niemals bis hier her gekommen! Danke an meine Kicker-Truppe für die ganze Leichtigkeit und all das Lachen! Ich sage nur: Wir vier!

Ariane, meine Labor Tante, ich kann nicht in Worte fassen wie dankbar ich Dir für einfach alles bin! In jeder Krise, mit jeder Panik und jedem Problem konnte ich auf Dich zählen, aber auch die freudigen Momente durfte ich mit Dir teilen. Ich liebe unseren Humor, dass wir so einfach mal Tränen lachen können, wenn kein anderer überhaupt den Witz versteht...aber auch durch so manch ernste Themen sind wir zusammen gegangen und für all das und unsere Freundschaft möchte ich Dir wirklich von Herzen danken! Ich habe so viel von Dir lernen dürfen und ohne Dich, Deine liebevolle Betreuung, Dein Lachen, Deine Witze, Deine ganze Hilfe bei sämtlichen Harvests und Dein Immer-Da-Sein hätte ich es wirklich nicht geschafft. DANKE!

An dieser Stelle auch ein Dank an mein persönliches „Gute-Laune-Labor“ bestehend aus Ariane, Marion und Timon – ihr konntet/könnt aufmuntern - das gibt es nicht.

Katha, was soll ich sagen? Du bist mein erstes Lächeln an jedem Arbeitstag. Dir kann ich immer mein Herz ausschütten, Du bist immer da, kannst so wahnsinnig gut zuhören, spürst manchmal schon wie es mir geht, bevor ich selbst es weiß und kannst unterscheiden wann es Zeit ist mich aus meinem Loch zu holen oder Dich einfach nur dazu zu hocken. Du verurteilst nie, sondern kannst mich immer so akzeptieren wie ich bin – eine Deiner allertollsten Eigenschaften! Aber auch der ganze Spaß, die tollen Gespräche, die legendären Parties, das Bei-Dir-Übernachten-Dürfen und dass Du mich so intensiv an Deinem Leben hast teilhaben lassen darf nicht unerwähnt bleiben!! Du bist der helle Wahnsinn, lass Dir niemals von jemandem etwas anderes erzählen! Für unser Kennenlernen allein hätten sich die letzten 3 Jahre schon gelohnt!

Danke an meine Schwester Juli dafür, dass Du mich in den letzten 3 Jahren so intensiv durch alle Höhen und Tiefen begleitet hast und mir tagtäglich beweist, wie lebenswert das Leben ist! Du bist mein Sonnenschein!

Danke an meinen Bruder Chrissi für Dein Zuhören, Deinen weisen Rat, Deine Vernunft, Deine Musik, Deinen grandiosen Humor und dass Reden so oft ganz unnötig ist.

Josie, es braucht nicht viele Worte. Ich danke Dir einfach, dass Du seit nun 15 Jahren an meiner Seite bist und von dort nicht abrückst, egal was passiert. Ohne Dich...ich will garnicht drüber nachdenken! Du bist meine Brücke über unruhigem Wasser!

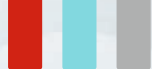
Angeli, für unsere tollen Spaziergänge in letzter Zeit und dass ich mich immer auf Dich verlassen darf möchte ich Dir besonders danken. Dein konstruktives Problemlösen hat mir schon so oft geholfen und ich hoffe sehr, dass wir noch ganz lange miteinander spazieren gehen.

Christian, Dir danke ich für unser gemeinsames fast halbes Leben...dafür, dass in Deiner Gegenwart „nichts so schlimm“ sein konnte und für alles was dieser Satz bedeutet. Du bist ein Teil von mir und ich danke Dir für das tief verflochtene Band, das uns verbindet.

Natürlich möchte ich auch meinen restlichen Freunden danken. Meine Lieben, danke Euch allen für das Lachen, die Kreativität, das Beratschlagen, die Notfall-Treffen und all unsere fantastischen Projekte! Ihr seid das Netz, das mich auffängt und ich bin gesegnet einen solchen Freundeskreis zu haben und unendlich dankbar dafür!

Bernd, danke für Dein wahnsinnig großes Verständnis in allen Dingen, danke, dass Du mich begleitest und mir die Welt neu erklärst und vor allem möchte ich Dir danken, dass Du in der bisher schwersten Zeit meines Lebens immer da warst, mich nicht alleingelassen, sondern immer wieder so liebevoll aufgefangen hast.

Weil das Beste zum Schluss kommt möchte ich nun nur noch meinen wundervollen Eltern danken. Ohne Euch, Eure bedingungslose Liebe, Euren Rückhalt, Euren Glauben in mich und Eure Hilfe wäre ich nicht der Mensch, der ich bin und ganz sicher nicht bis hier her gekommen. Danke, dass Ihr beide immer für mich da seid, komme was wolle. Ich liebe Euch sehr.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6390-0



9 783835 196390 0